Zur Kenntnis von Lithospermum officinale L.

Heinz Wolfgang König

1962

Zur Kenntnis von Lithospermum officinale L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Heinz Wolfgang König

aus

Säckingen a.Rh.

Juni 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEK LEIPZIG

Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 1962

INHALTSÜBERSICHT

Seite

EINLEITUNG 1

ALLGEMEINER TEIL 2

A. Antigonadotrop und antithyreotrop wirksame Pflanzen . . 2

B. Bisherige Kenntnisse über das aktive Prinzip von Lithospermum officinale L. 4

C. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 6

D. Bisherige Kenntnisse der Inhaltsstoffe von Lithospermumarten 7

E. Voruntersuchungen 9

F. Isolierung und Identifizierung eines Octadecatetraensäuregemisches aus den Früchten von Lithospermum officinale L. 17

I. Pharmakologischer Hinweis auf die Schilddrüsenwirksamkeit ungesättigter Fettsäuren 17

II. Vorproben 17

III. Isolierung 22

IV. Identifizierung 28

G. Untersuchung von Phosphatidfraktionen aus Früchten und Kraut von Lithospermum officinale L. 35

I. Herstellung von phosphatidhaltigen Fraktionen 35

II. Untersuchung der Phosphatidfraktionen 38

H. Versuche zur Gewinnung einer Saponin- bzw. Gerbstofffraktion und Isolierung eines Inositisomeren aus der Ganzdroge von Lithospermum officinale L. 44

I. Prüfung auf Saponine 44

II. Prüfung auf Gerbstoffe 45

III. Untersuchung der unbekannten reduzierenden Substanz mit dem R_f-Wert o,14 - o,16 46

IV. Isolierung und Identifizierung des freien Inositisomeren 49

I. Untersuchung von Aminosäure- und Peptidfraktionen aus der Ganzdroge von Lithospermum officinale L. 55

I. Aminosäuren 55

II. Peptide 59

J. Pharmakologische Untersuchung von Extrakten aus Lithospermum officinale L. und aus Lycopusarten 62

I. Antigonadotrope Wirksamkeit 63

II. Antithyreotrope Wirksamkeit 64

Seite

EXPERIMENTELLER TEIL 76
A. Pflanzenmaterial 76
B. Bereitung der Auszüge 76
C. Untersuchung der Fettsäurefraktion 77
I. Isolierung 77
II. Identifizierung 82
D. Untersuchung der Phosphatidgemische 86
I. Phosphatidanreicherung 86
II. Identifizierungsmaßnahmen 87
E. Isolierung und Identifizierung von Scyllit 91
I. Isolierungen 91
II. Identifizierung 93
F. Untersuchung von Aminosäure- und Peptidfraktionen . . 95
I. Isolierung 95
II. Identifizierung 96
G. Prüfung auf Saponine 97
H. Untersuchung der Gerbstoffraktion 99
I. Prüfung auf organische Pflanzensäuren 100
J. Prüfung auf Carotinoide 101
K. Gemeinsame Untersuchungsmethoden 102
I. Schmelz- und Mischschmelzpunkte 102
II. UV-absorptionsspektrophotometrische Untersuchungen 102
III. Infrarotspektren 102
IV. Mikroanalysen 102
L. Dünnschichtchromatographie 103
M. Papierchromatographie 104
I. Methodik 104
II. Fließmittel und R_f-Werte 105
III. Anfärbereagenzien 109
N. Pharmakologische Untersuchungen 113
I. Antigonadotrope Wirksamkeit 113
II. Antithyreotrope Wirksamkeit 113
O. Herkunft authentischer Substanzen 117

E I N L E I T U N G

Die Volksmedizin verwendet zur Behandlung von Erkrankungen endokriner Systeme, wie Schilddrüse, Nebenniere und Geschlechtsorgane seit langem Pflanzenauszüge mit hormonaler bzw. antihormonaler Wirkung. Da die Wirksamkeit dieser Drogen nicht sehr markant und zumeist auch wenig spezifisch ist, war das Interesse an diesen Pflanzen in der klassischen Pharmakologie lange Zeit sehr gering. Aus dem gleichen Grund blieben auch deren Inhaltsstoffe und ihr wirksames Prinzip unerforscht.

Überblickt man die Entwicklung des Arzneimittelmarktes, so hatte es bis vor kurzem den Anschein, als ob die im Handel befindlichen synthetischen Präparate diese sogenannten Volksheilmittel verdrängen würden. Da aber den Synthetica auch beträchtliche Nebenwirkungen zukommen können, wendet sich in jüngster Zeit das Interesse der Medizin wiederum den alten Volksheilmitteln zu. Inzwischen wurden vereinzelt biologisch aktive Stoffe aus Pflanzen isoliert.

Ein Markstein dieser Entwicklung war die von BUTENANDT und JACOBI[1)] erstmals durchgeführte Isolierung eines bislang nur aus dem Tierreich bekannten weiblichen Geschlechtshormons, des Östrons, aus Palmkern-Rückständen von Elaeis guineensis L.

Da in der Zwischenzeit auch die chemischen und pharmakologischen Grundlagen für die Erforschung biologisch aktiver Pflanzen verbessert werden konnten, bietet sich dem Analytiker und dem Pharmakologen die Möglichkeit und Aufgabe, sich mit diesen Drogen wieder eingehender zu beschäftigen.

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war es, Lithospermum officinale L. (Boraginaceae), eine Pflanze, die früher von Indianerstämmen Nevadas zur Schwangerschaftsverhütung verwendet wurde[2)], eingehender auf ihre Inhaltsstoffe zu untersuchen und Versuche anzustellen, das wirksame Prinzip zu ermitteln.

---

1) A.BUTENANDT u. H.JACOBI, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 218, 104 (1933)
2) P.TRAIN, J.R.HENRICHS u. W.A.ARCHER, "Medical Uses of Plants by Indian Tribes of Nevada", Washington D.C. 1941, Bd.II, S.102

A L L G E M E I N E R T E I L

A. Antigonadotrop und antithyreotrop wirksame Pflanzen

Besonderes pharmakologisches und klinisches Interesse erlangten in den letzten Jahren Pflanzen mit antigonadotroper und antithyreotroper Wirkung. Mit ihrer Hilfe gelang es in vielen Fällen, leichtere Formen einer Überfunktion der entsprechenden endokrinen Organe bei längerer Medikation zu heilen, so daß Extrakte aus diesen Pflanzen auch Eingang in den Arzneischatz gefunden haben.

So besitzen beispielsweise Weißkohlsaft[3] und die Samen verschiedener Brassicaarten, aus denen als wirksames Prinzip L-5-Vinyl-2-thiooxazolidon[4] isoliert werden konnte, thyreostatische Wirkung.

Auch das Wolfstrappkraut (Leonurus cardiaca L.), die Chinarinde (Cinchona succirubra PAVON), das Mutterkorn (Claviceps purpurea TUL.) sowie Blausäureglykoside enthaltende Pflanzen entfalten eine schilddrüsenhemmende Wirkung. Als antigonadotrop wirksam werden Extrakte aus Bärentraubenblättern (Arctostaphylos uva ursi SPRENG), Kardobenediktenkraut (Cnicus benedictus L.), dem weißen Gänsefuß (Chenopodium album L.), Borretsch (Borago officinalis L.) und der Himbeere (Rubus idaeus L.)[5] sowie aus der Felderbse (Pisum sativum L.)[6] genannt. In jüngster Zeit wurde außerdem über Pflanzen berichtet, denen eine antigonadotrope u n d antithyreotrope Wirksamkeit zukommen soll.

Lycopus virginicus L. und Lycopus europaeus L., deren antithyreotrope Aktivität schon seit langem bekannt ist[7], wurden von KEMPER und Mitarbeitern[8] auf ihre antigonadotrope Wirksamkeit untersucht. Es zeigte sich, daß die Wirkung von gonadotropen Hormonen verschiedener Herkunft und von thyreotropem Hormon durch

---

3) A.M.CHESNEY, T.A.CLAWSON u. B.WEBSTER, Bull.Johns Hopkins Hosp. 43, 261 (1928)
4) E.B.ASTWOOD, M.A.GREER u. M.G.ETTLINGER, J.biol.Chemistry 181, 121 (1949)
5) R.C.B.GRAHAM u. R.L.NOBLE, Endocrinology 56, 239 (1955)
6) S.N.SANYAL, Calcutta med.J. 49, 354 (1952)
7) G.MADAUS, F.E.KOCH u. G.ALBUS, Z.ges.exp.Med. 109, 411 (1941)
8) F.KEMPER, A.LOESER u.A.RICHTER, Arzneimittel-Forsch. 11, 92 (1961)

Gefriertrockenextrakte aus Lycopus virginicus L. in vitro abgeschwächt oder völlig aufgehoben werden kann.

Die Pflanze L i t h o s p e r m u m o f f i c i n a l e L., deren Inhaltsstoffe Gegenstand vorliegender Arbeit sein sollen, war bereits im Arzneischatz der Antike enthalten. Die Samen, die noch im Erg.B. 5 des DAB als Semen Milii solis (Sonnenhirse) aufgeführt waren, dienten, wahrscheinlich wegen ihres Aussehens, in Anlehnung an die Signaturenlehre zur Behandlung von Blasen- und Nierensteinen. Die Ganzdroge wurde zur Heilung von Geschwülsten, Geschwüren, Pocken, Gonorrhoe und Darmkatarrh verwendet. Die antioestrogene Natur der Lithospermumarten blieb jedoch unberücksichtigt.

Erstmals berichteten 1941 TRAIN, HENRICHS und ARCHER[9], daß verschiedene Indianerstämme Nevadas der Pflanze Lithospermum ruderale DOUGL. ex LEHM. schwangerschaftsverhütende Wirkung beimassen, Kaltwasserauszüge der ganzen Pflanze, über längere Zeit täglich genommen, bewirkten, je nach der Dosierung, eine vorübergehende oder dauernde Sterilität.

In der Folgezeit versuchten mehrere Arbeitsgruppen, für die verschiedenen Lithospermumarten experimentelle Grundlagen zur Deutung der antihormonalen Wirksamkeit zu schaffen.

Aus der Vielzahl der Versuchsergebnisse sind nennenswert: Die Unterdrückung des Brunstzyklus der Maus bei Injektion von Extrakten aus Lithospermum ruderale[10], Sekretionshemmung von Androgenen und Oestrogenen sowie Atrophie von Hoden, Ovarien und Schilddrüsen im Tierversuch[11] und die Inaktivierung von thyreotropem Hormon (TSH) und luteotropem Hormon (LTH), nicht aber von somatotropem (STH) und adrenocorticotropem Hormon (ACTH) bei in-vitro-Versuchen mit Lithospermum ruderale und Lithospermum officinale[12)13)14)]. Dagegen sollen einige in Frankreich vorkommende

---

9) P.TRAIN, J.R.HENRICHS u. W.A.ARCHER, "Medical Uses of Plants by Indian Tribes of Nevada", Washington D.C. 1941, Bd.II, S. 102
10) E.M.CRANSTON, G.R.KUCERA u. J.J.BITTNER, Proc.Soc.exp.Biol.Med. 75, 779 (1950)
11) R.L.NOBLE, E.R.PLUNKETT u.R.C.B.GRAHAM, J.Endocrinology 10, 212 (1954)
12) A.LOESER u. H.WERNZE, Klin.Wschr. 33, 538 (1955)
13) A.LOESER u. K.MIKULICZ, Klin.Wschr. 33, 1017 (1955)
14) A.LOESER, K.MIKULICZ u. K.OPITZ, Klin.Wschr. 34, 446 (1956)

Lithospermumarten keine antihypophysäre Wirksamkeit besitzen[15].

KEMPER[16] bewies in einer ausführlichen Arbeit die Gültigkeit dieser Einzelergebnisse auch für die Art Lithospermum officinale. Er schuf zugleich in vitro und in vivo experimentelle Grundlagen für eine klinisch-therapeutische Anwendung von Lithospermumextrakten bei Drüsenstörungen, die auf der Überfunktion einiger Hypophysenvorderlappenhormone beruhen. Der Autor konnte ferner die bereits früher vertretene Ansicht[17] unterstützen, daß die Inaktivierung der Hypophysenvorderlappenhormone erst nach ihrer Abgabe in den Kreislauf eintritt und nicht durch einen Angriff auf die Hormonbildungsstätten oder durch Beeinflussung der Erfolgsorgane zustande kommt. Er prägte die Bezeichnung "Hypophysen h o r m o n blocker".

Blockiert werden thyreotropes Hormon, die gonadotropen Wirkstoffe aus dem Hypophysenvorderlappen, aus dem Serum trächtiger Stuten und den Placenten (Choriongonadotropine) sowie luteotropes Hormon (Prolactin). Eine Wirkung auf das adrenocorticotrope Hormon scheint nicht zu bestehen. Es tritt auch eine vorübergehende Blutzuckersenkung auf (Antagonismus zum Glucagon der A-Zellen des Pankreas), doch ist diese als unspezifische, nicht-endokrine Funktion zu werten. Eine Blockierung von somatotropem Hormon konnte nicht festgestellt werden.

B. Bisherige Kenntnisse über das aktive Prinzip von Lithospermum officinale L.

Nach den experimentellen Befunden einzelner Arbeitskreise, die sich mit den Problemen der Isolierung wirksamer Inhaltsstoffe und der pharmakologischen Prüfung fraktionierter Substanzgemische aus Lithospermumarten beschäftigten, ist die Frage nach dem antihormonalen Prinzip weiterhin ungeklärt.

---

15) F.STUTINSKI, Rev.int.Bot.appl.Agric.trop. 32, 186 (1952)
16) F.KEMPER, Arzneimittel-Forsch. 9, 368, 411 (1959)
17) R.L.NOBLE, E.R.PLUNKETT u. R.C.B.GRAHAM, J.Endocrinology 10, 212 (1954)

BRENEMAN und CARMACK[18] berichteten über die Fraktionierung eines wässrigen Extraktes aus Lithospermum ruderale mittels Säulenchromatographie an Zellulosepulver. Sie erhielten fünf Fraktionen, von denen zwei blutzuckersenkende Wirkung besaßen. Mit ihrer Annahme, daß es sich bei der glucagonantagonistischen Wirkung um eine Parallele zur Inaktivierung von Choriongonadotropinen und anderen Proteinhormonen handeln müsse, stellten sich die Verfasser in klaren Widerspruch zu den pharmakologischen Ergebnissen von KEMPER[19], der eine unspezifische, nicht-endokrine Wirkung annahm.

Die von BRENEMAN und CARMACK beschriebenen biologisch aktiven Fraktionen waren völlig farblos und klar. Anzeichen einer Fällung der Hormone konnten bei in-vitro-Versuchen nicht beobachtet werden. Skelton und GRANT[20] diskutierten jedoch auf Grund ihrer Ergebnisse die Bildung von großen kolloidalen Komplexen zwischen den Hypophysenvorderlappenhormonen und den in Lithospermumarten reichlich vorhandenen Phlobatanninen, denen eine hormonale Wirkung fehlen soll.

Lediglich aus den Versuchen von KEMPER ergeben sich einige Hinweise auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften, die dem wirksamen Prinzip zukommen müssen:
Man weiß, daß die Droge bei rascher Trocknung und trockener Lagerung jahrelang ihre Wirksamkeit behält, aber ohne diese Aufbereitungsart bald unwirksam wird. Wässrige Extrakte besitzen in frischbereitetem Zustand volle biologische Aktivität, nicht aber Auszüge, die mit Alkohol, Äther, Chloroform, Petroläther oder Azeton hergestellt werden. Einwirkung von Hitze (30 Minuten bei 80°), Zusatz von Säuren oder Basen (pH unter 5.8 und über 8.6) und Langzeitbestrahlung mit UV-Licht (256 Stunden) bewirken Abschwächung oder Verlust des aktiven Prinzips. Behandlung der Auszüge mit Aktivkohle sowie Zusatz von Blutseren verschiedener Tiere haben ebenfalls eine Abschwächung der Wirksamkeit zur Folge.

---

18) W.R.BRENEMAN u. M.CARMACK, Endocrinology 10, 212 (1954)
19) F.KEMPER, Arzneimittel-Forsch. 9, 368, 411 (1959)
20) F.R.SKELTON u. G.A.GRANT, Amer.J.Physiol. 167, 379 (1951)

Diese Angaben besitzen für die phytochemische Untersuchung der Droge große Bedeutung. Sie dürfen jedoch in Bezug auf die Extrahierbarkeit des wirksamen Prinzips nicht allzu eng aufgefaßt werden. Man wird immer auch die lösungsvermittelnden Eigenschaften der Haupt- und Nebeninhaltsstoffe sowie der Ballaststoffe in Erwägung ziehen müssen, vor allem, wenn mit Lösungsmittelgemischen gearbeitet wird.

C. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die phytochemische Analyse einer Pflanze im Hinblick auf ihr wirksames Prinzip kann nach zwei Methoden erfolgen:

I. Analytisch-chemische Arbeiten und pharmakologisches Experiment im Parallelversuch

Hierbei wechseln sich Analytik und pharmakologische Prüfung der Fraktionen bis zur Auffindung des wirksamen Prinzips ab.

II. Pflanzenanalyse und anschließende pharmakologische Prüfung von isolierten Reinsubstanzen oder Substanzgemischen

Nach einer orientierenden Voruntersuchung, mit welchen Stoffen gerechnet werden kann, wird als vorläufiges Ziel die Isolierung und Identifizierung von definierten Reinsubstanzen oder Substanzgemischen angestrebt. Hierauf folgt die biologische Prüfung.

Zur Wahl der letztgenannten Methode führten uns folgende Überlegungen: Die Inhaltsstoffe von Lithospermum officinale sind bisher nur wenig, biologisch aktive Substanzen nicht bekannt. Da die Droge beim Lagern allmählich, wässrige Extrakte sogar sehr schnell ihre Wirksamkeit verlieren, müßten nach der erstgenannten Methode die Fraktionierungsarbeiten ständig von Anfang an wiederholt werden. Die zweite Methode bietet außerdem die Möglichkeit, nach erfolgreichem Abschluß von Isolierungs- und Identifizierungsarbeiten auch synthetische und chemisch verwandte Substanzen zu prüfen.

D. Bisherige Kenntnisse der Inhaltsstoffe von Lithospermumarten

Die folgende Zusammenstellung gibt einen Überblick über die bisher bekannten Inhaltsstoffe verschiedener Lithospermumarten:

I. Lithospermum officinale L.

1.) In der Wurzel die Kohlenhydrate Glucose, Saccharose und Glucofructosan[21], zwei gesättigte Fettsäuren der Summenformel $C_{14}H_{28}O_2$ und $C_{16}H_{32}O_2$ und eine Hydroxyfettsäure ($C_{24}H_{48}O_3$)[22], sowie ein rotes Pigment, Lithospermumrot genannt, das in der Wurzelrinde lokalisiert sein soll[23];

2.) in der Ganzdroge β-Sitosterin[24], Rutin[25] und Bornesit, ein Monomethyläther des Inosits[26];

3.) in den Früchten 17 - 20% fettes Öl[27], dessen unverseifbarer Anteil aus einem aliphatischen Alkohol (Smp 73°), drei Sterinen (Smp 117°), 139° und 144°) und einem orangefarbenen Pigment, der Fett-säureanteil aus Palmitin- und Stearinsäure, Hexadecadien- und Octadecatriensäure (einem Isomeren der Linolensäure ?) und den Hydroxysäuren Hydroxypentacosaen-($C_{25}H_{48}O_3$) und Hydroxyeicosatriensäure ($C_{20}H_{34}O_3$) besteht[28]; ferner Vitamin E[29] und ein hoher Gehalt an Pflanzenasche (29.3%), bestehend aus 59% CaO, 27% SiO_2 und kleineren Mengen K_2O, MgO, P_2O_5, SO_3, Na_2O und Fe_2O_3[30],

---

21) R.BOURDU, Rev.gén.Bot. 64, 153, 197 (1957); ref.C.A. 51, 16752 (1957)
22) A.SOSA, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 246, 1731 (1958)
23) C.WEHMER, "Die Pflanzenstoffe", Bd.II, Jena 1931, S. 1018
24) W.DAVIS u. W.C.J.ROSS, Chem.and Ind. 1955, S. 1739; ref.C.A. 50, 6749 (1956)
25) C.CHARRAUX, Bull.Soc.Chim.biol. 6, 631 (1924)
26) V.PLOUVIER, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 247, 2190 (1958)
27) K.MOLDENHAWER, Przemyst Spozywczy 7, 58 (1953); ref.C.A. 51, 8455 (1957)
28) A.SOSA, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 246, 1731 (1958)
29) S.YA.ZOLOTNITSKAYA u. G.O.AKOPYAN, ref. C.A. 53, 8317 (1959)
30) C.WEHMER, "Die Pflanzenstoffe", Bd.II, Jena 1931, S. 1018

II. Lithospermum ruderale DOUGL. ex LEHM.

1.) in der Wurzelrinde Allantoin (5-Ureidohydantoin)[31];

2.) in den oberirdischen Teilen eine wachsartige Säure (Smp 77 - 78°), Rutin, ein Inositderivat (Smp 207 - 208°) und ein Nitrilglykosid (Smp 220 - 222°)[32]; ferner Stoffe, die charakteristische Phlobatanninreaktionen ergeben[33], zwei Flavone mit einer Hydroxylgruppe in C_5-Stellung und im unverseifbaren Rückstand drei höhere Carbonsäuren der C_{24}-, C_{26}- und C_{28}-Reihe sowie zwei Alkohole der C_{20}- und C_{22}-Reihe[34];

III. Lithospermum purpureo-coeruleum L.

1.) in den unterirdischen Teilen ebenfalls Allantoin, außerdem ein Steroid (Smp 138°) und ein Polyterpenabkömmling (Smp 312°)[35];

2.) in der Ganzdroge ebenfalls Bornesit[36], ein Alkohol der Summenformel $C_{26}H_{54}O$ (Smp 77.5°), zwei Wachse der Summenformel $C_{35}H_{70}O_2$ und $C_{40}H_{80}O_2$, Tannine und die Kohlenhydrate Glucose, Saccharose, Fructose und Stachyose[37];

IV. Lithospermum canescens (MICHAUX) LEHM.

in der Wurzelrinde Naphtochinon[38];

V. Lithospermum erythrorhizon SIEB. et ZUCC.

in der Wurzel das Chinon d-Alkannin (Tokioviolett), das in der Pflanze primär als Monoazetylverbindung vorkommt 39)40).

---

31) A.SOSA, C.SOSA-BOURDOUIL u. C.HARDY, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 240, 1570 (1955)
32) M.GORMAN, S.BIEN u. D.GINSBURG, Bull.Research Council Israel 5A, 253 (1956); ref. C.A. 52, 15828 (1958)
33) F.R.SKELTON u. G.A.GRANT, Amer.J.Physiol. 167, 379 (1951)
34) J.W.KLEBER u. O.GISVOLD, J.Amer.pharmac.Assoc.,sci.Edit. 41, 218 (1952)
35) A.SOSA, C.SOSA-BOURDOUIL u.C.HARDY, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 240, 1570 (1955)
36) S.BIEN u. D.GINSBURG, J.chem.Soc. (London) 1958/3, S. 3189
37) A.SOSA, C.SOSA-BOURDOUIL u. C.HARDY, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 240, 1570 (1955)
38) D.S.VAN FLEET, Phytomorphology (India) 4, 300 (1954); ref.C.A. 49, 9749 (1955)
39) R.MAJIMA u.C.KURODA, ref.Chem.Zbl. III, 677 (1922)
40) H.BROCKMANN u. H.ROTH, Naturwissenschaften 23, 246 (1935)

E. Voruntersuchungen

Wir stellten Pflanzenauszüge durch Kaltmazeration und Soxhletextraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln in der Reihenfolge Petroläther, Äther, Chloroform, Methanol und Wasser her.

Mit den filtrierten und eingeengten Extrakten führten wir Vorproben chemischer und papierchromatographischer Art auf einzelne Stoffklassen durch. Soweit die Ergebnisse für eine antihormonale Wirksamkeit von Bedeutung sein könnten und die Untersuchungen eingehendere analytische Arbeiten erfordern, wird über diese Stoffgruppen in eigenen Kapiteln berichtet (vgl. Kapitel F bis I).

I. Prüfung auf Carotinoide

Aus dem braungelb gefärbten, nur schwach chlorophyllhaltigen Petrolätherauszug der Soxhletextraktion fiel beim Abkühlen ein ziegelroter Niederschlag aus, den wir durch Umfällen aus methanolhaltigem Petroläther reinigten. Die papierchromatographische Prüfung mit dem Laufmittelsystem Benzol/Petroläther/Azeton (20:5:4)[41] ergab einen langausgezogenen, orangeroten Fleck nahe der Laufmittelfront, der im UV-Licht grünlich fluoreszierte und am Tageslicht rasch verblaßte. Wir führten, wie bei ZECHMEISTER[42] beschrieben, mehrere Farbreaktionen auf Carotinoide durch, die sämtlich positiv verliefen. Es gelang, die Substanz über eine Polyamidsäule[43] durch Elution mit Methanol in drei verschieden gefärbte Zonen zu fraktionieren. Das UV-Absorptionsspektrum zeigte die für Carotinoide charakteristischen Maxima zwischen 400 und 500 mμ.

---

41) L.BAUER, Naturwissenschaften 39, 88 (1952)
42) L.ZECHMEISTER in G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. III/2, Wien 1932, S. 1274
43) W.GRASSMANN, H.HÖRMANN u. A.MARTL, Makromolekulare Chem. 21, 37 (1956)

Tabelle 1

UV-Absorptionsmaxima von Carotinoidfraktionen aus Lithospermum officinale

Fraktion	Farbe (Tageslicht)	Maxima (mμ) in Methanol		
A (unterste Zone)	gelb	265	445	470
B (mittlere Zone)	orangerot	300	420	440
C (obere Zone)	rot		445	475

II. Prüfung auf Phytosterine

Im Petrolätherauszug der Früchte und im Chloroformextrakt der Ganzdroge konnten wir dünnschichtchromatographisch anhand von Testsubstanzen lediglich β-Sitosterin, das bereits SOSA[44] aufgefunden hatte, nachweisen. Die Chromatographie auf Kieselgeldünnschichtplatten[45] in den Systemen Chloroform und Benzol lieferte einen schwach rötlich fluoreszierenden Fleck, der nach Besprühen mit Antimontrichloridlösung und Trocknen bei 100° eine leuchtend weinrote Farbe annahm. Die Chromatographie mit Benzol erwies sich als sehr vorteilhaft, da Chlorophyll in Startpunktnähe festgehalten wurde, während die Carotinoide zur Lösungsmittelfront wanderten. Die mit eingeengtem Extrakt durchgeführte Liebermann-Burchard-Reaktion[46] verlief positiv. Außer dem beschriebenen, bereits von SOSA nachgewiesenen β-Sitosterin, konnten auf diesem Wege keine weiteren Steroidkörper erkannt werden.

III. Prüfung auf Fettsäuren

Aus dem Petrolätherextrakt der Lithospermumfrüchte erhielten wir durch alkalische Hydrolyse und anschließende Ätherausschüttelung aus saurer Lösung den Gesamtfettsäureanteil.

44) A.SOSA, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 246, 1731 (1958)
45) E.STAHL, Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958)
46) C.H.BRIESKORN u. H.HERRIG, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 485 (1959)

Wie papierchromatographische Untersuchungen nach dem "reversed-phase"-Verfahren[47)48)] und Nachweisreaktionen mit Kupferazetat-Kaliumferrocyanid[49)] und Osmiumtetroxiddampf[50)] zeigten, enthielt das Gemisch mehrere gesättigte und ungesättigte Fettsäuren.

Die eingehendere Untersuchung des Neutralfettanteils ist in Kapitel F, "Isolierung und Identifizierung eines Octadecatetraensäuregemischs aus den Früchten von Lithospermum officinale L.", beschrieben.

IV. Prüfung auf Phosphatide

Die Äther- und Chloroformauszüge aus Früchten und Ganzdroge versetzten wir zur Gewinnung einer Phosphatidfraktion mit überschüssigem Azeton. Bei Kühlraumtemperatur (-15 bis -20°) fiel ein bräunlicher Stoff aus, den wir durch zweimaliges Umfällen mit Azeton aus chloroformhaltiger Lösung reinigten. Die papierchromatographische Prüfung erfolgte auf einem Formaldehyd-imprägnierten Papier[51)] mit Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) als Laufmittelsystem.

Während die Ätherauszüge mit den üblichen Anfärbereagenzien Ninhydrin[52)], Phosphormolybdänsäure[53)], Rhodamin B[54)], Nilblau[55)] und Ammoniummolybdat-Perchlorsäure[56)] nur schwache

---

47) J.POKORNY, Naturwissenschaften 43, 375 (1956)
48) L.HÖRHAMMER, F.WINTERSBERGER u. H.WAGNER, Arch.Pharmaz.Ber. dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 545 (1959)
49) H.P.KAUFMANN u. W.H.NITSCH, Fette und Seifen 56, 154 (1954)
50) M.H.HACK, Biochem.J. 54, 602 (1953)
51) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)
52) R.J.CONSDEN, A.H.GORDON u. A.J.P.MARTIN, Biochem.J. 38, 224(1944)
53) L.DOUSTE-BLAZY, J.POLONOVSKI u. P.VALDIGUIE, C.R.hebd.Séances Acad. Sci. 235, 1643 (1952); ref. C.A. 47, 5981 (1953)
54) G.V.MARINETTI u. E.STOLZ, J.Amer.chem.Soc. 77, 6668 (1955)
55) M.H.HACK, Biochem.J. 54, 602 (1953)
56) C.S.HANES u. F.A.ISHERWOOD, Nature 164, 1107 (1949)

Nachweise ergaben, schienen die beiden Chloroformauszüge Phosphatide in größeren Mengen zu enthalten. Wir nahmen daher eine nähere Charaktersierung der Gemische vor, die in Kapitel G, "Untersuchung von Phosphatidfraktionen aus Früchten und Kraut von Lithospermum officinale L.", beschrieben ist.

V. Prüfung auf Alkaloide

Zur papierchromatographischen Prüfung auf Alkaloide in freier oder salzartiger Form untersuchten wir die Chloroform- und Methanolextrakte sowie einen wässrig-sauren Auszug.

Als Fließmittel dienten Toluol/Isobutanol (1:1), Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) und Isopropanol/Ameisensäure/Wasser (2:5:5).

Nach Besprühen der Chromatogramme mit modifiziertem Dragendorff-Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUF[57] trat keinerlei positive Reaktion auf.

VI. Prüfung auf freie Cumarine

Zur papierchromatographischen Untersuchung verwendeten wir die mit Petroläther, Äther und Chloroform bereiteten Auszüge aus Ganzdroge. Als Laufmittel dienten die Systeme Petroläther/Benzol p.a./Methanol 95%ig (100:5:5) und Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5)[58].

Weder vor noch nach dem Besprühen der Chromatogramme mit Kalilauge konnten wir eine UV-Fluoreszenz, die vielen Cumarinen eigen ist, feststellen. Auch die Mikrosublimation und Versuche, auf dem Chromatogramm eine Diazoreaktion[59] durchzuführen, verliefen ergebnislos.

---

57) R.MUNIER u. M.MACHEBOEUF, Bull.Soc.Chim.biol. 33, 846 (1951)
58) A.BAERHEIM SVENDSEN, "Zur Chemie Norwegischer Umbelliferen", Oslo 1954, S. 36
59) W.BORSCHE, Ber.dtsch.chem.Ges. 37, 346 (1904)

VII. Prüfung auf Saponine

Da der Methanolextrakt beim Einengen im Vakuum stark schäumte, war mit der Anwesenheit von Saponinen zu rechnen. Versuche, durch Fällen mit absolutem Äthanol eine gereinigte Saponinfraktion zu erhalten, scheiterten zunächst daran, daß sich ausschließlich braungefärbte, schmierige Niederschläge bildeten. Durch Vorlage eines Überschusses an absolutem Äthanol und tropfenweiser Zugabe des Extraktes (Verhältnis Äthanol/Extrakt = 3:1) gewannen wir einen grobflockigen, hellbraunen Niederschlag. In Anbetracht der zahlreichen chemischen Nachweisreaktionen und papierchromatographischen Untersuchungen des Stoffgemisches vor und nach saurer bzw. alkalischer Hydrolyse soll im Rahmen dieser Vorprüfungen auf eine Wiedergabe verzichtet werden. Die analytischen Arbeiten sind in Kapitel H, "Versuche zur Gewinnung einer Saponin- bzw. Gerbstoffraktion und Isolierung eines Inositisomeren aus der Ganzdroge von Lithospermum officinale L.", beschrieben.

VIII. Prüfung auf Gerbstoffe

Bei der Herstellung wässriger Lithospermumauszüge erhielten wir selbst in starken Verdünnungen dunkelbraun gefärbte Lösungen. Auch Methanol und Äthanol extrahierten in reichlichem Maße Stoffe, die in konzentrierter Lösung braune, schmierige, gut wasserlösliche Präzipitate ergaben. Mit Eisen-III-chloridlösung traten schwarzgrüne Färbungen auf. Mit Gelatinelösung entstand sofort ein Niederschlag.

Die nähere Untersuchung eines durch Fällung aus methanolischer Lösung gewonnenen Gerbstoffgemisches erfolgte, wie bei SCHMIDT[60] beschrieben, mittels allgemeiner und differenzierender chemischer Reaktionen. Sie wird ebenfalls in Kapitel H, "Versuche zur Gewinnung einer Saponin- bzw. Gerbstoffraktion und Isolierung eines Inositisomeren aus der Ganzdroge von Lithospermum officinale L.", beschrieben.

---

60) O.TH.SCHMIDT in PAECH-TRACEY "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd.III, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 517

IX. Prüfung auf Aminosäuren und Peptide

Nach der Methode von VIRTANEN[61] erhielten wir aus einem wässrigen Extrakt der Ganzdroge eine aminosäurefreie und eine aminosäurehaltige Fraktion. Die papierchromatographische Untersuchung dieses Auszugs im System Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) ergab nach Besprühen mit Ninhydrinlösung 8 Flecken im R_f-Bereich zwischen 0.09 und 0.57. Neben der den Aminosäuren nach Ninhydrinbehandlung eigenen Purpurfärbung zeigten einige Flecken stahlblaue Farbe, die als Hinweis für das Vorhandensein von Peptiden gelten kann.

Da die papierchromatographischen Trennungs- und Nachweismethoden eine besondere Technik erforderten, würde die Beschreibung der Versuche über den Rahmen der Vorprüfungen hinausgehen. Sie werden daher in Kapitel I, "Untersuchung von Aminosäure- und Peptidfraktionen aus der Ganzdroge von Lithospermum officinale L.", näher erläutert.

X. Prüfung auf Kohlenhydrate

Die bei der Anreicherung der Aminosäuren erhaltene Neutralstoffraktion chromatographierten wir mit den Laufmittelsystemen Pyridin/Äthylazetat/Wasser (2:7:1) (I) und Isopropanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) (II). Nach Besprühen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung traten mehrere in der Kälte stark reduzierende Flecken auf. Nach Entwickeln der Chromatogramme über Dampf zeigte sich ein weiterer Fleck mit niedrigem R_f-Wert von 0.10 in I und 0.14 - 0.16 in II.

Versuche, diesen Stoff zu isolieren und zu identifizieren, wurden mit der Strukturaufklärung eines Inositisomeren abgeschlossen. Die Isolierungsstadien und die Diskussion der erhaltenen Versuchsergebnisse sind Gegenstand von Kapitel H, "Versuche zur Gewinnung einer Saponin- bzw. Gerbstoffraktion und Isolierung eines Inositisomeren aus der Ganzdroge von Lithospermum officinale L.".

---

61) A.I.VIRTANEN, Angew.Chemie 67, 381 (1955)

XI. Prüfung auf organische Pflanzensäuren

Bei der papierchromatographischen Untersuchung des Methanolextraktes in den Laufmittelsystemen Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) und Essigsäure 15%ig traten mehrere im UV-Licht blau fluoreszierende Flecken auf, die bei der Behandlung mit Ammoniakdämpfen zugleich Verstärkung und Veränderung ihrer Fluoreszenzen zeigten.

Daß es sich hierbei um phenolische Stoffe handelte, konnte durch Besprühen der Chromatogramme mit Eisen-III-chloridlösung nachgewiesen werden. Zur Herstellung einer gereinigten Säurefraktion wandten wir die B l e i f ä l l u n g s m e t h o d e [62] an. Auf Zusatz von neutralem und basischem Bleiazetat erhielten wir insgesamt 3 Präzipitate: Niederschlag I durch Fällung mit neutralem Bleiazetat in schwach essigsaurer Lösung, Niederschlag II nach Neutralisation des Filtrates und Niederschlag III nach Alkalisieren des Filtrates und Zugabe von basischer Bleiazetatlösung. Die einzelnen Niederschläge fraktionierten wir auf Grund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit in Äthanol und verdünnter Essigsäure.

Wie spätere papierchromatographische Untersuchungen zeigten, enthielt Niederschlag I die Hauptmenge der organischen Pflanzensäuren. Zur weiteren Reinigung dieser Fraktion schüttelten wir eine alkoholische, auf pH = 3 angesäuerte Lösung zehnmal mit Äthylazetat aus. Die P a p i e r c h r o m a t o g r a p h i e der essigsauren alkoholischen Phase mit dem System Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) ergab neben 3 unbekannten Flecken mit den R_f-Werten 0.25, 0.30 und 0.48 einen Fleck mit R_f = 0.19, der auf Grund von Testsubstanzen und seiner charakteristischen blaßlilafarbenen UV-Fluoreszenz mit E l l a g s ä u r e identisch sein dürfte.

In der Äthylazetatphase wiesen wir papierchromatographisch fünf Flecken nach, deren R_f-Werte und UV-Fluoreszenzen in Tabelle 2 zusammengestellt sind. Zwei von ihnen konnten wir der

62) R.BRIEGER in G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd.I, Wien 1931, S. 586

K a f f e e s ä u r e und der C h l o r o g e n s ä u r e zuordnen. Die Identifizierung der übrigen Flecken steht mangels Testsubstanzen noch aus.

T a b e l l e 2

Ergebnis der Papierchromatographie von organischen Pflanzensäuren

Laufmittel-system	R_f-Werte	Fluoreszenz im UV-Licht	UV-Fluoreszenz nach NH_3-Behandlung	Farbe nach $FeCl_3$-Behandlung	zutreffende authent. Säuren
B/E/W *) (4:1:5)	0.79-0.81	hellblau	intensiv hellblau	graugrün	Kaffeesäure[63] (R_f = 0.82)
B/E/W *) (4:1:5)	o.72	hellblau	intensiv hellblau	graugrün	?
B/E/W *) (4:1:5)	0.65-0.66	schwach blau	grüngelb	graugrün	Chlorogensäure 63) (R_f = 0.66)
B/E/W *) (4:1:5)	0.48-0.51	gelbbraun	gelbbraun	grau	?
B/E/W *) (4:1:5)	0.31	schwach gelblich	gelb	grau	?
Essigsäure 15%ig	0.41-0.43	hellblau	intensiv hellblau	graugrün	Kaffeesäure[63] (R_f = 0.45)
Essigsäure 15%ig	0.49-0.50	schwach gelblich	gelb	grau	?
Essigsäure 15%ig	0.58-0.60	hellblau	intensiv hellblau	graugrün	?
Essigsäure 15%ig	0.69-0.70	schwach blau	grüngelb	graugrün	Chlorogensäure 63) (R_f = 0.71)
Essigsäure 15%ig	0.79-0.81	gelbbraun	gelbbraun	grau	?

63) K.HERRMANN, Pharmazie 13, 266 (1958)
*) Butanol/Essigsäure/Wasser

F. Isolierung und Identifizierung eines Octadecatetraensäuregemisches aus den Früchten von Lithospermum officinale L.

I. Pharmakologischer Hinweis auf die Schilddrüsenwirksamkeit ungesättigter Fettsäuren

Mit Hilfe des Kaulquappenmetamorphosetests prüfte KEMPER[64] natives sowie mit Azeton extrahiertes Pulver aus getrockneten Früchten von Lithospermum officinale auf antithyreotrope Wirksamkeit. Beide Zubereitungen zeigten eine deutliche Aktivität. Die Metamorphosehemmung, die durch Schilddrüsenunterfunktion bzw. thyreostatische Arzneimittel bedingt sein kann, war im Vergleich zu den Kontrolltieren verstärkt. Jedoch war die Metamorphosequote der mit extrahiertem Pulver behandelten Tiere höher als der mit nativem behandelten, d.h., die Metamorphosehemmung war im ersten Fall geringer.

KEMPER diskutiert für diesen Effekt die in den Früchten öfters vorhandenen ungesättigten Fettsäuren, denen eine stoffwechselhemmende Eigenschaft zukommen soll.

Da man auf Grund dieser Versuche, die am Kaltblüter durchgeführt wurden, nur bedingt Schlüsse auf eine Wirkung am Säugetier oder am Menschen ziehen kann, muß die pharmakologische Prüfung einer reinen Fettsäurefraktion abgewartet werden, bevor man über diese Frage Auskunft geben kann.

In der vorliegenden Untersuchung haben wir daher den Neutralfettanteil der Früchte von Lithospermum officinale einer Prüfung unterzogen und uns vor allem auf die Isolierung und Identifizierung eventuell vorhandener höher ungesättigter Fettsäuren konzentriert.

II. Vorproben

Zur Gewinnung einer Fettsäurefraktion gingen wir vom petrolätherlöslichen Anteil der Früchte aus, der 8.2% ausmachte und aus einer gelbbraunen, öligen Flüssigkeit mit der Jodzahl 155 bestand.

64) F.KEMPER, Arzneimittel-Forsch. 9, 368, 411 (1959)

Nach Hydrolyse mit methanolischer Kalilauge unter Zusatz von Ascorbinsäure als Oxydationsschutz[65] und Entfernung des unverseifbaren Anteils aus alkalischer Lösung, erhielten wir durch Ausschütteln des angesäuerten Hydrolysats mit peroxidfreiem Äther die G e s a m t f e t t s ä u r e n in einer Ausbeute von 74%.

Zur Prüfung auf die einzelnen Fettsäuren zogen wir die P a p i e r c h r o m a t o g r a p h i e nach dem "reversed-phase"-Verfahren heran[66][67]. Gesättigte Fettsäuren chromatographierten wir mit reiner Essigsäure, ungesättigte Fettsäuren mit 90%iger Essigsäure als Laufmittelsystem. Für gesättigte Fettsäuren verwendeten wir ein mit 10%iger, für ungesättigte Fettsäuren ein mit 20%iger Paraffinlösung imprägniertes Papier. Zur Sichtbarmachung sämtlicher Fettsäuren färbten wir mit Kupferazetat-Kaliumferrocyanidlösung[68] an. Zum differenzierenden Nachweis von ungesättigten Fettsäuren setzten wir die Chromatogramme dem Dampf von Osmiumtetroxid aus[69].

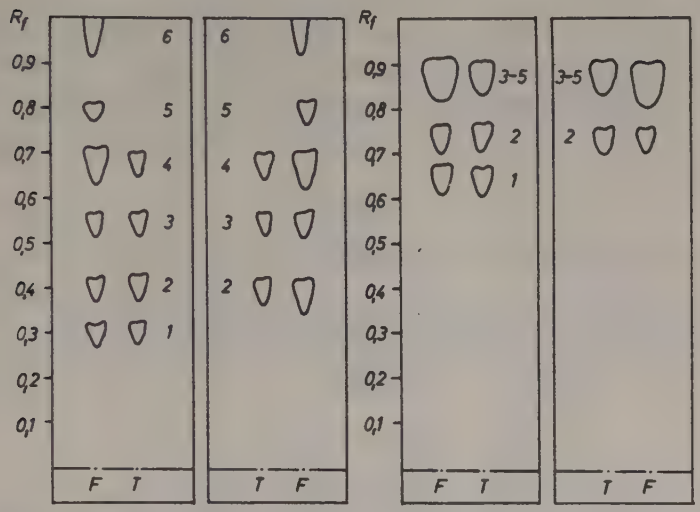
Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 1 dargestellt. Öl-, Linol- und eine unbekannte Polyensäure wurden papierchromatographisch erstmalig nachgewiesen, während Stearin- und eine C_{18}-Triensäure durch die Befunde von SOSA[70] bereits bekannt waren.

Der Nachweis von Palmitinsäure war auf papierchromatographischem Wege nicht möglich, da Öl- und Palmitinsäure ein sogenanntes "kritisches Paar" bilden[71]. Sie soll jedoch nach SOSA ebenfalls im Gemisch vorhanden sein.

---

65) L.HÖRHAMMER, F.WINTERSBERGER u. H.WAGNER, Arch.Pharmaz.Ber. dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 545 (1959)
66) J.POKORNY, Naturwissenschaften 43, 375 (1956)
67) L.HÖRHAMMER, F.WINTERSBERGER u. H.WAGNER, Arch.Pharmaz.Ber. dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 545 (1959)
68) H.P.KAUFMANN u. W.H.NITSCH, Fette und Seifen 56, 154 (1954)
69) M.H.HACK, Biochem.J. 54, 602 (1953)
70) A.SOSA, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 246, 1731 (1958)
71) H.P.KAUFMANN u. H.KIRSCHNEK, Fette, Seifen einschl.Anstrichmittel 58, 492 (1956)

Papierchromatographische Übersicht der Fettsäurezusammensetzung von Lithospermumfrüchten bei Verwendung verschiedener Papiere, Laufmittelsysteme und Anfärbemethoden.



Entwicklung	Essigsäure 90%ig (paraffiniertes Papier 20%ig)		Essigsäure, rein (paraffiniertes Papier 10%ig)	
Anfärbung	$(CH_3COO)_2Cu + K_4[Fe(CN)_6]$	OsO_4	$(CH_3COO)_2Cu + K_4[Fe(CN)_6]$	OsO_4

Abb. 1

F = Fettsäuregemisch
T = Testgemisch

1 = Stearinsäure
2 = Palmitin-(bzw. Ölsäure)
3 = Linolsäure
4 = Linolensäure
5 = unbekannte Polyensäure
6 = Oxydationsprodukte

Nach diesen Vorversuchen war es von Interesse, ob höher ungesättigte Fettsäuren im Gemisch vorhanden waren. Zur Klärung dieser Frage eignet sich am besten die A l k a l i - I s o m e r i s i e r u n g nach HOLMANN und BURR[72]. Gleichzeitig kann hiermit die quantitative Verteilung der einzelnen ungesättigten Fettsäuren ermittelt werden.

Unter dem Einfluß von starkem Alkali werden bei hohen Temperaturen die vorhandenen isolierten Doppelbindungen in konjugierte übergeführt. Diese ergeben im UV-Bereich charakteristische Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen.

T a b e l l e 3

Absorptionsmaxima von Konjuensäuren im UV-Bereich

Anzahl der Doppelbindungen	Charakteristische Absorptionsmaxima bei mμ Wellenlänge						
Dien	233						
Trien	233	268	280				
Tetraen	233	268	280	300	314		
Pentaen	233	268	280	300	314	330	346

Wie aus Tabelle 3 und Abbildung 2 hervorgeht, weisen die bei 300 und 314 mμ und außerdem die bei 236, 268 und 278 mμ auftretenden Maxima auf das Vorhandensein einer Tetraensäure hin. Qualitativ läßt sich aus dem UV-Spektrum mit Sicherheit nur diejenige ungesättigte Fettsäure erkennen, die die meisten Doppelbindungen aufweist, da diese mit den weniger ungesättigten Fettsäuren alle typischen Maxima im kurzwelligen Bereich gemeinsam hat.

72) R.T.HOLMAN u. G.O.BURR, Arch.Biochemistry 19, 474 (1948)

UV-Absorptionsspektrum der Gesamtfettsäuren nach Alkali-Isomerisierung

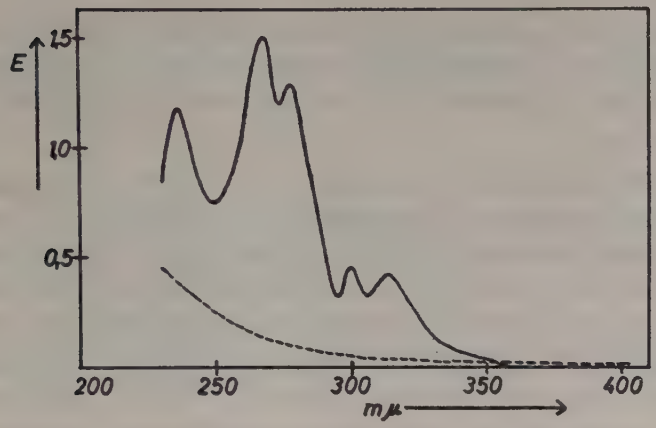


Abb. 2

----- = Spektrum vor Isomerisierung
——— = Spektrum nach Isomerisierung

Infolge Summation der Extinktionswerte läßt sich jedoch aus den überhöhten Maxima bei 236, 268 und 278 mμ eine beträchtliche Menge Triensäure voraussagen. Das Spektrum vor der Isomerisierung ergab keinerlei Maxima, d.h., konjugierte Fettsäuren können im ursprünglichen Gemisch nicht vorhanden sein.

Legt man zur Ermittlung der prozentualen Mengenverhältnisse von Fettsäuregemischen die Berechnung von KAUFMANN[73] zu Grunde, so erhält man ungefähr folgende Zusammensetzung:

6.3% Dien-, 41.7% Trien- und 18.3% Tetraensäure. Da diese Berechnungsweise nur für C_{18}-Fettsäuren strenge Gültigkeit besitzt, können derart ermittelte Werte im allgemeinen nur einen Uberblick über die Mengenverhält-

73) H.P.KAUFMANN, "Analyse der Fette und Fettprodukte", Bd.I, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958, S. 762

nisse geben. Diese Einschränkung scheint jedoch in unserem Falle nicht gegeben, da ungesättigte Fettsäuren pflanzlichen Ursprungs vorwiegend der C_{18}-Reihe angehören[74].

III. Isolierung

Aus der azetonhaltigen Lösung der Gesamtfettsäuren entfernten wir den gesättigten Fettsäureanteil in Anlehnung an die Methode von DEBUCH[75] durch fünffaches Ausfrieren bei -20 bis -30°.

Die quantitative Abtrennung der gesättigten Fettsäuren gelang uns ebenso wie HÖRHAMMER und Mitarbeitern[76] nur bei mehrfacher Wiederholung dieses Arbeitsganges und mehrmaligem Konzentrieren der Lösung. Eine Filtration der Niederschläge war nicht durchzuführen, da sich die abgeschiedenen Fettsäuren bei normaler Temperatur sofort verflüssigten. Gesättigte Fettsäuren in reiner Form sind bei -30° in Azeton praktisch unlöslich. Sobald jedoch gleichzeitig ungesättigte vorhanden sind, wirken diese als Lösungsvermittler. Nur durch rasches Arbeiten und Vorkühlen sämtlicher Geräte war es möglich, den gesättigten Anteil abzuzentrifugieren.

Eine quantitative Isolierung ließ sich daher durch die dauernden Fettsäureverluste nicht durchführen.

Das Filtrat, das ausschließlich ungesättigte Fettsäuren enthielt, fraktionierten wir bei -70° durch mehrfache T i e f k ü h l k r i s t a l l i s a t i o n [77]. Papierchromatographisch konnten wir in den Filtraten eine allmähliche Abnahme der Monoen-, Dien- und Triensäureanteile und eine Konzentrationszunahme der Tetraensäure beobachten. Nach der dritten Ausfällung ließ sich keine weitere Anreicherung der Tetraensäure im Filtrat feststellen. Da die Reinigung der Tetraensäure

---

74) T.P.HILDITCH, "The Chemical Constitution of Natural Fats", New York 1956, S. 537
75) H.DEBUCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 304, 109 (1956)
76) L.HÖRHAMMER, F.WINTERSBERGER u.H.WAGNER, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch. pharmaz.Ges. 292/64, 545 (1959)
77) G.DI MODICA u.F.F.ROSSI, Chim.analytique 34, 271 (1952)

durch fraktionierte Destillation der Methylester infolge der geringen Substanzmengen praktisch undurchführbar war, versuchten wir, die Trennung der Tetraensäure von der in weit größerem Maße vorhandenen Triensäure durch multiplikative Verteilung nach CRAIG[78] zu lösen. Bereits HÖRHAMMER und Mitarbeitern war es auf diesem Wege gelungen, aus dem Rinderherzmuskel eine Δ 5,8,11,14,17 n-Eikosapentaensäure ohne Überführung in den Methylester und fraktionierte Destillation rein zu isolieren.

Wir verwendeten zunächst das von HÖRHAMMER und Mitarbeitern angegebene Verteilungsgemisch Ameisensäure 85%ig/Wasser/Azeton/Benzin Sdp. 50 - 75° (10:1.2:58.8:80) (System A), das für die beiden erstgenannten Fettsäuren einen relativ günstigen "Trennfaktor" besitzen soll. Bei einer Verteilung über 100 Stufen erhielten wir das in Tabelle 4 und Abbildung 3 dargestellte Ergebnis.

Tabelle 4

Ergebnis der 1. Craig-Verteilung über 100 Stufen

Gruppe	Elemente	Fettsäuren
I	0-14	leer
II	15-30	Oxydationsprodukte
III	31-34	reine Tetraensäure
IV	35-44	Tetraen- und Triensäure
V	45-48	Tetraen-, Trien- und Spuren von Diensäure
VI	49-52	Tetraensäure, daneben Trien-, Dien- und Spuren von Monoensäure
VII	53-60	Spuren von Tetraensäure, außerdem Trien-, Dien- und Monoensäure
VIII	61-74	Trien-, Dien- und Monoensäure sowie drei ungesättigte Fettsäuren mit niedrigerem R_f-Wert
IX	75-84	ungesättigte Fettsäure mit R_f 0.1 - 0.12*)
X	85-100	leer

78) L.C.CRAIG, J.biol.Chemistry 155, 519 (1944)
*) Laufmittelsystem: Essigsäure 90%ig auf paraffiniertem Papier

Da die erhaltene Menge reiner Tetraensäure sehr gering war, faßten wir die einzelnen Gruppen in eine tetraensäurehaltige reine (Elemente 31-34), eine aus Tetraensäure und anderen Polyenen bestehende (Elemente 35-52) und eine tetraensäurefreie Fraktion (Elemente 53-84) zusammen.

Chromatographische Übersicht über die Gruppen der 1.Craig-Verteilung

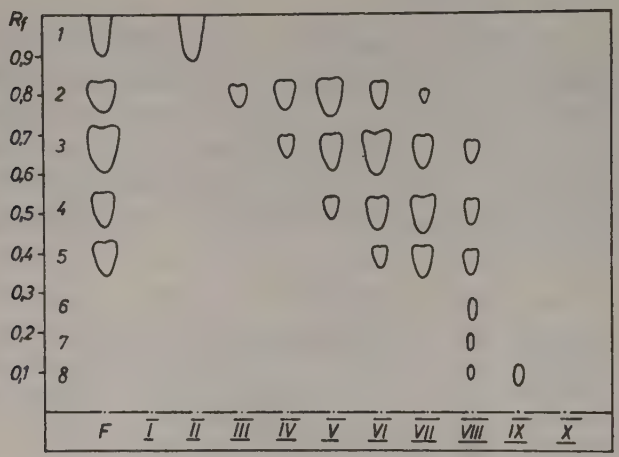


Abb. 3

1 = Oxydationsprodukte
2 = unbekannte Tetraensäure
3 = Linolensäure
4 = Linolsäure
5 = Ölsäure
6-8 = ungesättigte Fettsäuren unbekannter Art
F (Filtrat) = Ausgangsgemisch

Entwicklung: aufsteigend mit 90%iger Essigsäure auf paraffiniertem Papier

Anfärbung: mit Osmiumtetroxiddampf.

Die Fraktion, die Tetraensäure im Gemisch mit anderen Polyenen enthielt, unterwarfen wir einer erneuten Craig-Verteilung mit System A. Zur dritten Verteilung gelangte neue, durch Tiefkühlkristallisation bei -70° vorgereinigte Substanz. Für die folgenden Verteilungen verwendeten wir die zuvor erhaltenen Fraktionen, die aus Tetraensäure und anderen Polyenen bestanden. Zur Verbesserung des Trenneffektes nahmen wir die Verteilungen 3 bis 6 mit einem modifizierten System B vor, das folgende Zusammensetzung hatte: Ameisensäure 85%ig/Wasser/Methanol/Benzin Sdp. 50 - 75° (10:3:57:80).

Auf diese Weise erhielten wir aus 7.25 g Filtrat der Tiefkühlkristallisationen 45.3 mg papierchromatographisch reine Tetraensäure, was einer Ausbeute von 0.62% entspricht.

Die einzelnen Isolierungsstadien verfolgten wir papierchromatographisch in beschriebener Weise, wobei sich zur Trennung der ungesättigten Fettsäuren insbesondere die Methode mit 90%iger Essigsäure eignete. Der Gang der Analyse ist auf Seite 27 schematisch zusammengefaßt.

Die Trennfaktoren für C_{18}Tetraen- und Triensäure in verschiedenen Lösungsmittelsystemen, die von HÖRHAMMER und Mitarbeitern anhand der gesättigten Fettsäuren mit gleichem Verteilungskoeffizienten Laurin- und Caprinsäure ermittelt wurden, liegen in den Grenzen zwischen 1.3 und 1.9. Für das System A besitzt er den Wert 1.34.

Es war daher in unserem Falle von Anfang an kein guter Verteilungseffekt zu erwarten. Wir versuchten mit Hilfe von System B die Trennung dadurch zu verbessern, daß wir Azeton durch Methanol ersetzten und bei gleichen Anteilen Benzin den Wasserzusatz erhöhten. Die Mischbarkeit von Ober- und Unterphase ist jetzt, wie aus der mixotropen Reihe der Flüssigkeiten ersichtlich[79], wesentlich herabgesetzt. Den Ameisensäurezusatz behielten wir bei, da einerseits Ameisensäure stark reduzierend wirkt, andererseits ganz allgemein durch Säurezusatz

79) E.HECKER, Chimia (Zürich) 8, 229 (1954)

der Trenneffekt erhöht wird[80].

Der Trennfaktor für System B ergab sich nach experimenteller Bestimmung aus dem Quotienten Laurinsäure/Caprinsäure mit dem Wert 2.01.

Eine weitere Verbesserung des Ergebnisses erreichten wir durch Einsatz größerer Lösungsmittelvolumina, Vornahme der Verteilung im Scheidetrichter und Einsatz größerer Substanzmengen.

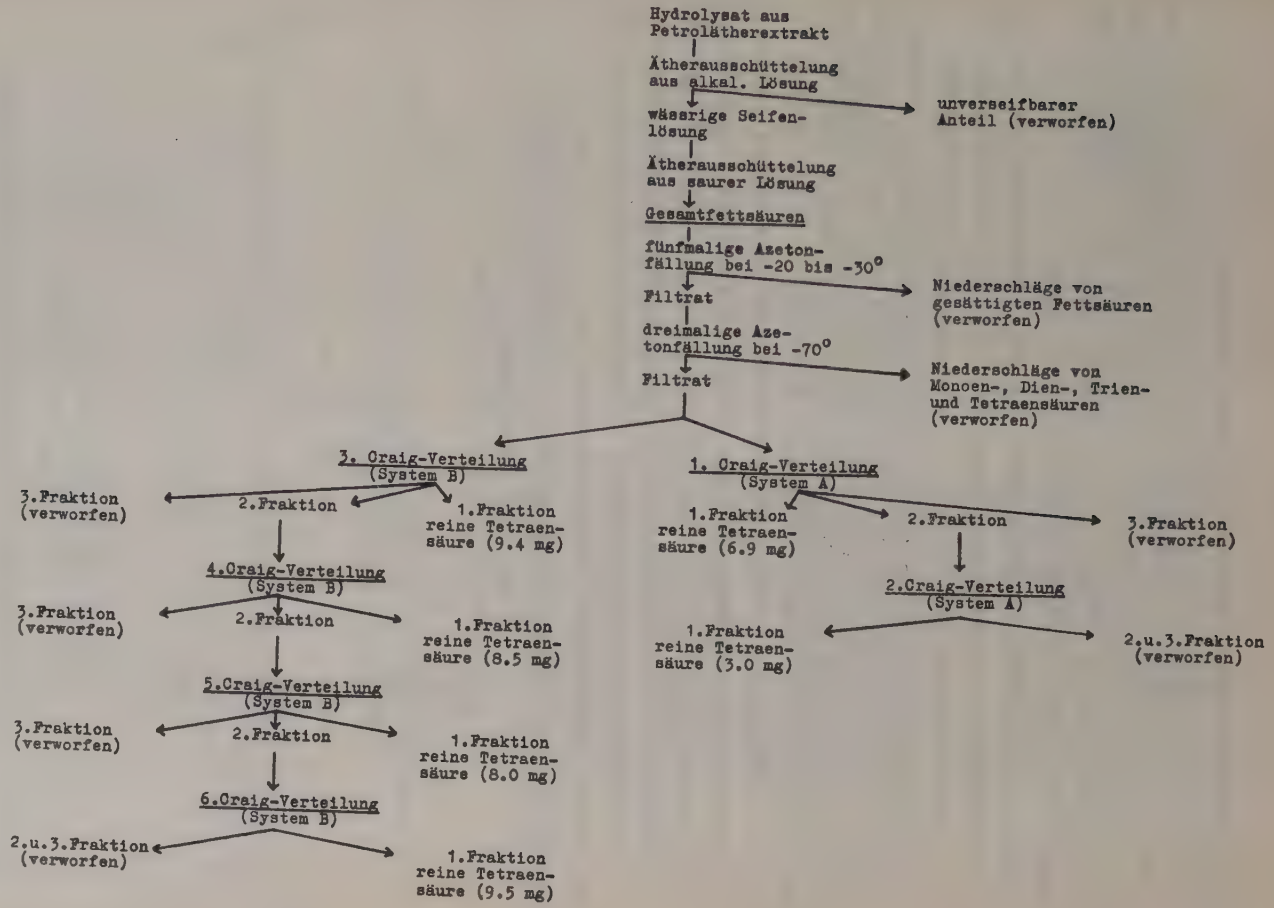
Auch gelang die scharfe Abtrennung der Oxydationsprodukte in den Unterphasen der Elemente 1 und 2 mit System B besser als mit System A. Die Ausbeute an reiner Tetraensäure konnte, wie die auf Seite 27 zusammengefaßten Ergebnisse der Verteilungen 1 bis 6 zeigen, durch die genannten methodischen Abänderungen wesentlich erhöht werden. In den Gruppen VIII und IX der 1. Craig-Verteilung (vgl.Abb. 3) konnten wir drei ungesättigte Fettsäuren mit niedrigen R_f-Werten (0.10 - 0.12, 0.17 und 0.26 - 0.27)*) nachweisen, die vor der Verteilung nicht in Erscheinung getreten waren. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Monoensäuren niedriger Kohlenstoffreihen.

---

80) E.JANTZEN, "Das fraktionierte Destillieren und das fraktionierte Verteilen als Methoden zur Trennung von Stoffgemischen", Dechema Monographie, Verlag Chemie, Berlin 1932, S. 48

*) Laufmittelsystem: Essigsäure 90%ig auf paraffiniertem Papier

Schematische Darstellung des Isolierungsganges



IV. Identifizierung

Auf Grund der papierchromatographischen Ergebnisse, der multiplikativen Verteilungen und der mehrfach durchgeführten Alkali-Isomerisierungen mußte es sich bei der isolierten Substanz um eine Tetraensäure handeln.

Zur Prüfung auf Reinheit unterwarfen wir die isolierte Polyensäure in bereits beschriebener Weise einer erneuten quantitativen A l k a l i - I s o m e r i s i e r u n g . Abbildung 4 stellt das UV-Absorptionsspektrum einer reinen Tetraensäure dar. Es ist durch die etwa gleichgroßen Extinktionswerte bei 235, 268, 278, 300 und 315 mμ charakterisiert. Der Prozentgehalt errechnete sich zu 76%.

Diese Abweichung vom theoretischen Wert ist einerseits dadurch zu erklären, daß die Isomerisierung meist nicht quantitativ verläuft, und andererseits daß, wie KLENK und Mitarbeiter[81)82)] mehrfach feststellten, isolierte Polyene oft Isomerengemische darstellen, die wahrscheinlich verschieden stark isomerisiert werden können.

UV-Absorptionsspektrum der isolierten Polyensäure nach Alkali-Isomerisierung

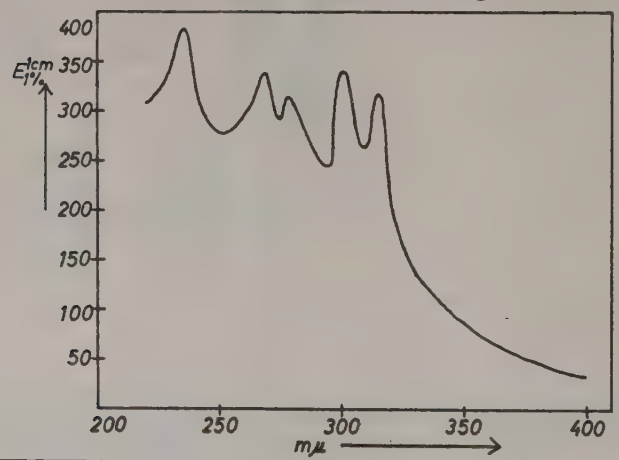


Abb. 4

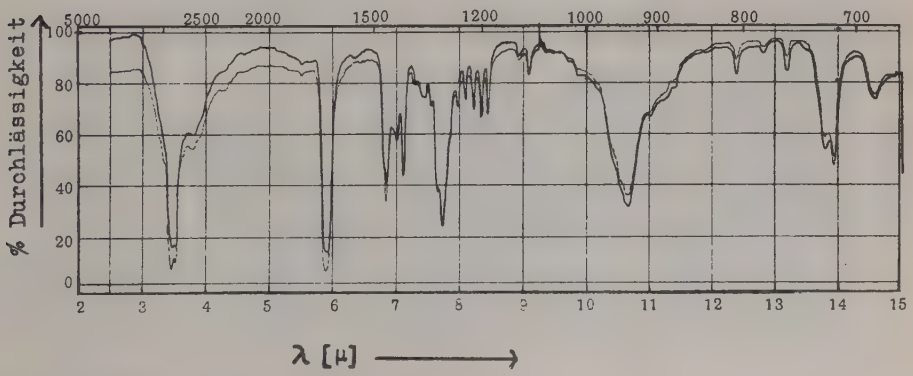
81) E.KLENK u. L.BRUCKNER-VOIGT, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 324, 1 (1961)
82) E.KLENK u. D.EBERHAGEN, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 322, 258 (1960)

Um die Kettenlänge unserer Tetraensäure zu ermitteln, nahmen wir eine H y d r i e r u n g mit CH-Bestimmung und IR-Spektrum des Hydrierungsproduktes vor. Da dieser Vorgang in äthanolischer Lösung meist nicht quantitativ erfolgt, verwendeten wir Eisessig als Lösungsmittel[83] unter Zugabe von Platinoxid als Katalysator. Zur Untersuchung gelangte Tetraensäure im Gemisch mit wenig Triensäure. Wie die anschließende papierchromatographische Prüfung zeigte, war die Hydrierung quantitativ verlaufen.

Mit 75%iger Ausbeute erhielten wir ein einziges Hydrierungsprodukt, das in seinem papierchromatographischen Verhalten, im Schmelz- und Mischschmelzpunkt von 69.5 - 70.0° und in seinen C H - W e r t e n mit authentischer Stearinsäure übereinstimmte. Das I R - S p e k t r u m der hydrierten Fettsäure zeigte die für freie Carbonsäuren charakteristischen OH-Valenzschwingungen bei 2899 und 2817 cm^{-1}, die C=O-Valenzschwingung der Carboxylgruppe bei 1695 cm^{-1}, die Bandenreihe zwischen 1250 und 1176 cm^{-1}, weiterhin Carboxylbanden bei 1299 und 1429 cm^{-1} und schließlich die für längere kontinuierliche Kohlenstoffketten typischen C-H-Deformationsschwingungen bei 727 und 719 cm^{-1}. Es stimmte mit dem der authentischen S t e a r i n s ä u r e überein.

IR-Überlagerungsspektren von hydrierter C_{18}-Tetraensäure und authentischer Stearinsäure "Merck"

Abb. 5



83) L.HÖRHAMMER,F.WINTERSBERGER u.H.WAGNER,Arch.Pharmaz.Ber.dtsch. pharmaz.Ges. 292/64, 545 (1959)

Damit war der exakte Beweis für eine C_{18}-Tetraensäure erbracht. Zur Feststellung der Doppelbindungslagen führten wir eine Ozonisierung und Ozonidspaltung durch. Nach quantitativer Ozoneinwirkung*) spalteten wir das Perozonid bei 35° oxydativ mit Perhydrol in essigsaurer Lösung nach KLENK und BONGARD[84]. Da nach der alten Harries'schen Methode[85)86)87)] die aus dem Divinylmethanrest entstehende Malonsäure leicht in Azetaldehyd und Kohlendioxid zerfällt, empfehlen KLENK und BONGARD zur Erhöhung der Ausbeute an Malonsäure eine möglichst niedrige Temperatur bei der Ozonidspaltung.

Die im Vakuum auf wenige Tropfen eingeengte Lösung prüften wir papierchromatographisch auf die entstandenen Abbau-mono- und dicarbonsäuren. Monocarbonsäuren chromatographierten wir aus einer mit Ammoniak alkalisierten Lösung mit dem Laufmittelsystem 1n-Ammoniak in 78%igem Äthanol[88)], Dicarbonsäuren aus essigsaurer Lösung mit den Lösungsmittelgemischen Butanol/Essigsäure/Wasser (5:1:10)[89)] und Äthanol 95%ig/Ammoniak/Wasser (8:1:1).

Da die R_f-Werte der Dicarbonsäuren in sauren und basischen Laufmittelgemischen immer sehr nahe beieinander lagen und keine eindeutige Identifizierung gestatteten, chromatographierten wir diese zusätzlich zweidimensional-absteigend. Besondere Trennfähigkeit soll die zweidimensionale Methode besitzen, wenn in den beiden Laufrichtungen abwechselnd basische und saure Lösungsmittelsysteme verwendet werden[90)].

---

84) E.KLENK u. W.BONGARD, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 290, 181 (1952)
85) C.HARRIES u. C.THIEME, Liebigs Ann.Chem. 343, 311 (1905); Ber.dtsch.chem.Ges. 39, 3728 (1906)
86) C.HARRIES u. H.O.TÜRK, Ber.dtsch.chem.Ges. 39, 3732 (1906)
87) C.HARRIES u. W.FRANK, Liebigs Ann.Chem. 374, 288 (1910)
88) A.SEHER, Fette,Seifen einschl.Anstrichmittel 58, 401 (1956)
89) J.W.H.LUGG u. B.T.OVERELL, Nature (London) 160, 87 (1947)
90) H.WOLLMANN u. R.POHLOUDEK-FABINI, Pharmazie 16, 21 (1961)
*) Für die leihweise Überlassung des Ozonisators danken wir Herrn Professor Dr.R. Huisgen, Direktor des Instituts für Organische Chemie der Universität München.

Zwar sind solche Laufmittelpaare in der Literatur häufig beschrieben, aber auch hier bedurfte es langwieriger Versuche, bis schließlich die Kombination des von BUTENANDT, STAMM und HECKER[91] zur Strukturaufklärung des Bombykols verwendeten basischen Paarlings (Äthanol/Äthylamin 16%ig = 8:2) in erster Richtung, mit dem von MUNIER und MACHEBOEUF[92] für Dicarbonsäuren empfohlenen sauren (n-Propanol/Eucalyptol/Ameisensäure 98%ig = 5:5:2, wassergesättigt) in zweiter Richtung den gewünschten Trenneffekt ergab.

Wir fanden P r o p i o n s ä u r e , M a l o n - , B e r n s t e i n - und A d i p i n s ä u r e , daneben wenig G l u t a r - und A z e l a i n s ä u r e und aus den nicht abgedampften Lösungsmittelresten Essig- bzw. Peressigsäure (vgl. Abb. 6).

Schematische Darstellung von Papierchromatogrammen der Mono- (a) und Dicarbonsäuren (a, b und c) aus der Ozonidspaltung

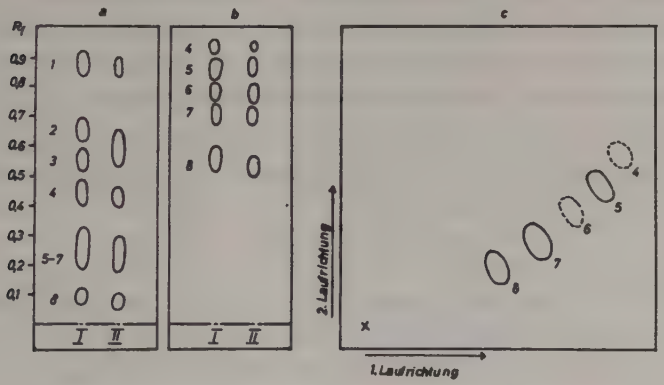


Abb. 6

I authentische Mono- und Dicarbonsäuren	1 = Propion-	5 = Adipin-
	2 = Essig-	6 = Glutar
II Ozonidspaltprodukte	3 = Peressig-	7 = Bernstein-
	4 = Azelain-	8 = Malonsäure

91) A.BUTENANDT, A.STAMM u. E.HECKER, Chem.Ber. 94, 1931 (1961)
92) R.MUNIER u. M.MACHEBOEUF, Bull.Soc.Chim.biol. 34, 380 (1952)

Entwicklung: a) absteigend-durchlaufend mit 1n-Ammoniak in 78%igem Äthanol

b) absteigend mit Butanol/Essigsäure/Wasser (5:1:10)

c) absteigend mit Äthanol/Äthylamin 16%ig (8:2) in der 1.Richtung und n-Propanol/Eucalyptol/Ameisensäure 98%ig (5:5:2, wassergesättigt) in der 2.Richtung

Anfärbung: a) mit Silbernitrat-Glucose-Reagens nach GORE[93])

b) mit Bromphenolblaulösung

c) mit Bromkresolgrün- und Bleiazetatlösung nach MUNIER u.MACHEBOEUF [94])

Die nach der Ozonidspaltung auftretenden geringen Mengen Essig- bzw. Peressigsäure, die nur bei der Chromatographie aus alkalischer Lösung sichtbar waren, stören den Nachweis der übrigen Säuren nicht. Da sie als Fettsäurespaltprodukte nicht in Frage kommen, können sie unberücksichtigt bleiben.

Die nachgewiesene Propionsäure, als einzige Monocarbonsäure, deutet an, daß sich die endständige Doppelbindung am C_{15} befindet. Um die Lage der anderen Doppelbindungen näher zu charakterisieren, sind für die Diskussion die außerdem gefundenen Dicarbonsäuren Malon-, Bernstein- und Adipinsäure heranzuziehen.

Malonsäure weist auf Divinylmethan-, Bernsteinsäure auf Divinyläthangruppierungen und Adipinsäure auf eine Folge von C_6-Einheiten ohne Doppelbindung hin.

Da sich C_6- und C_4-Bruchstücke bei Vorliegen einer C_{18}-Tetraensäure gegenseitig ausschließen, muß mit großer Wahrscheinlichkeit ein Isomerengemisch vorgelegen haben. Während in früheren Jahren bei Isolierungen von Polyensäuren stets einheitliche Produkte angenommen wurden, gelang es in neuerer Zeit KLENK und Mitarbeitern Isomerengemische zu analysieren, die sich verteilungschromatographisch nicht trennen ließen. Hierbei können die Isomeren entweder in ungefähr gleichem Verhältnis (z.B. 40 und 60%)[95]) vorliegen oder aber das eine Isomere nur in sehr kleinen Mengen[96]).

93) R.POHLOUDEK-FABINI u. H.WOLLMANN, Pharmazie 16, 57 (1961)
94) R.MUNIER u. M.MACHEBOEUF, Bull.Soc.Chim.biol. 34, 380 (1952)
95) E.KLENK u. L.BRUCKER-VOIGT, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.324, 1 (1961)
96) E.KLENK u.D.EBERHAGEN, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 322, 258 (1960)

Die für die beiden Dicarbonsäuren Bernstein- und Adipinsäure erhaltenen intensiven Nachweise scheinen die letztgenannte Möglichkeit auszuschließen.

Wir nehmen daher an, daß ein Gemisch aus Δ4,8,12,15- und Δ6,9,12,15-n-Octadecatetraensäure vorgelegen hatte. Ob Bernstein- und Adipinsäure die Bruchstücke des Carboxylendes darstellen, wurde nicht näher untersucht, ist aber wahrscheinlich.

Die nach der Ozonidspaltung schwach nachweisbare Azelainsäure dürfte von einer geringfügigen Verunreinigung durch Δ9,12,15-Octadecatriensäure stammen.

In pflanzlichem Material wurde bisher lediglich die konjugierte Δ9,11,13,15-n-Octadecatetraensäure, auch Parinarsäure genannt, aufgefunden[97]. Sie scheidet aus, da das Tetraensäuregemisch vor der Alkali-Isomerisierung kein Konjugiertenspektrum zeigte.

Einer abschließenden Erörterung bedarf die zwar kleine, aber doch deutlich nachweisbare Menge Glutarsäure im Gemisch der Abbaudicarbonsäuren. Das UV-Spektrum der nicht isomerisierten Tetraensäure zeigte bei mehrtägigem Aufbewahren der Substanz eine schwache Absorption im Dien- und Trienbereich, die im ursprünglichen Gemisch nicht vorhanden war. Diese Tatsache weist auf die Gegenwart einer konjugierten Triensäure hin, die im Laufe der Aufbereitung als Verunreinigung entstanden sein mußte. Aus Δ4,8,12,15-n-Octadecatetraensäure wäre die Bildung von C_5-Bruchstücken durchaus denkbar. Solche Spontanisomerisierungen, die des öfteren vorkommen sollen, stören jedoch die Konstitutionsaufklärung nicht wesentlich, da meist nur eine der 4 bis 5 Doppelbindungen ihre Lage verändert[98].

Auch muß auf Grund der von verschiedenen Seiten gemachten Erfahrung eine Kettenverkürzung der Adipinsäure in Erwägung gezogen werden[99)100]. Dagegen erscheint die Möglichkeit einer Ver-

---

97) M.TSUJIMOTO u.H.KOYANAGI, J.Soc.Chem.Ind.Japan 36, 110 B, 673 B (1933)
98) E.KLENK u. H.DREIKE, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 300, 113(1955)
99) A.RIECHE, R.MEISTER u. H.SAUTHOFF, Liebigs Ann.Chem.533, 187(1942)
100) K.ZIEGLER, E.EIMERS,W.HECHELHAMMER u. H.WILMS, Liebigs Ann. Chem. 567, 43, 64 (1950)

unreinigung mit Δ5,8,11,14,17-n-Eikosapentaensäure, die mit C_{18}-Tetraensäuren ein kritisches Paar bildet, nach dem Hydrierungsergebnis ziemlich ausgeschlossen.

Ergebnis der Identifizierungsversuche

Auf Grund der Ergebnisse der Alkali-Isomerisierung, der Hydrierung mit CH-Bestimmung und IR-Spektrum und des oxydativen Ozonidabbaus nehmen wir für die von uns isolierte Polyensäure ein Isomerengemisch folgender Zusammensetzung an:

Δ4,8,12,15- und Δ6,9,12,15-n-Octadecatetraensäure

$H_3C-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-COOH$

$H_3C-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$

Der einschlägigen Literatur zufolge wurde, wie bereits erwähnt, in pflanzlichem Material lediglich die konjugierte Δ9,11,13,15-n-Octadecatetraensäure, auch Parinarsäure genannt, aufgefunden. Die von uns diskutierten Polyensäuren sind bisher im Pflanzenreich noch nicht beschrieben, dagegen in tierischem Material des öfteren nachgewiesen worden. Die erstmalige Isolierung und Strukturaufklärung der Δ4,8,12,15-n-Octadecatetraensäure, die auch als Stearidon- oder Moroctsäure bezeichnet wird, erfolgte durch TOYAMA und TSUCHIYA[101] aus Sardinenöl. Die isomere Δ6,9,12,15-n-Octadecatetraensäure wurde erstmals von KLENK und BROCKERHOFF[102] aus Heringsöl in reiner Form gewonnen.

Eine zu Beginn der Fraktionierungsarbeiten mit dem Tiefkühlkristallisat durchgeführte Hydrierung ergab als einziges Hydrierungsprodukt Stearinsäure. Damit stehen unsere Ergebnisse in Widerspruch zu den Befunden von SOSA[103], der aus dem ungesättigten Fettsäureanteil von Lithospermumfrüchten außer C_{18}- und C_{16}-Fettsäuren auch solche der C_{20}- und C_{25}-Reihe isolierte, dieser aber ohne Hydrierung und Alkali-Isomerisierung nur durch Schmelzpunkte und CH-Bestimmungen charakterisiert hatte.

101) Y.TOYAMA u. H.TSUCHIYA, Bull.chem.Soc.Japan 10, 192 (1935)
102) E.KLENK u. H.BROCKERHOFF, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 307, 272 (1957)
103) A.SOSA, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 246, 1731 (1958)

G. Untersuchung von Phosphatidfraktionen aus Früchten und Kraut von Lithospermum officinale L.

Auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Jod- und Phosphorgehalt in der Schilddrüse wurde in den letzten Jahren wiederholt hingewiesen[104]. Weiterhin ist bekannt, daß mit der Hyperthyreose eine Senkung der Plasmalipoidwerte verbunden ist[105] und daß eine direkte Beziehung zwischen Fettstoffwechsel und den Jodthyroninen besteht[106].

Wir hielten es daher für angebracht, aus verschiedenen Pflanzenteilen Phosphatidfraktionen herzustellen und diese einer näheren Prüfung zu unterziehen.

I. Herstellung von phosphatidhaltigen Fraktionen

Nachdem die Voruntersuchungen (vgl. Kapitel E) auf die Anwesenheit von Phosphatiden in Früchten und Kraut hingewiesen hatten, verwendeten wir zu ihrer Anreicherung in Anlehnung an die Methoden von FOLCH[107] und DEBUCH[108] nach dem Entfetten mit Petroläther die erschöpfende Soxhletextraktion mit Chloroform/Methanol (3:1). Aus der eingeengten Lösung fällten wir die Phosphatide bei Kühlraumtemperatur (ca. -15°) mit der fünffachen Menge Azeton aus und reinigten die Gemische durch zweimaliges Umfällen in gleicher Weise, wobei wir R o h p h o s p h a t i d g e m i s c h e mit Ausbeuten (Naßgewichte) von 1.8% für Früchte bzw. 1.3% für Ganzdroge erhielten. Während das Phosphatidgemisch aus Früchten bereits weitgehend rein war, enthielt das Gemisch aus der Ganzdroge, wie die Liebermann-Burchard-Reaktion[109] und papierchromatographische Prüfungen zeigten, Verunreinigungen in reichlichem Maße. Auch Reste von Chlorophyll ließen sich auf diesem Wege nicht beseitigen. Zu

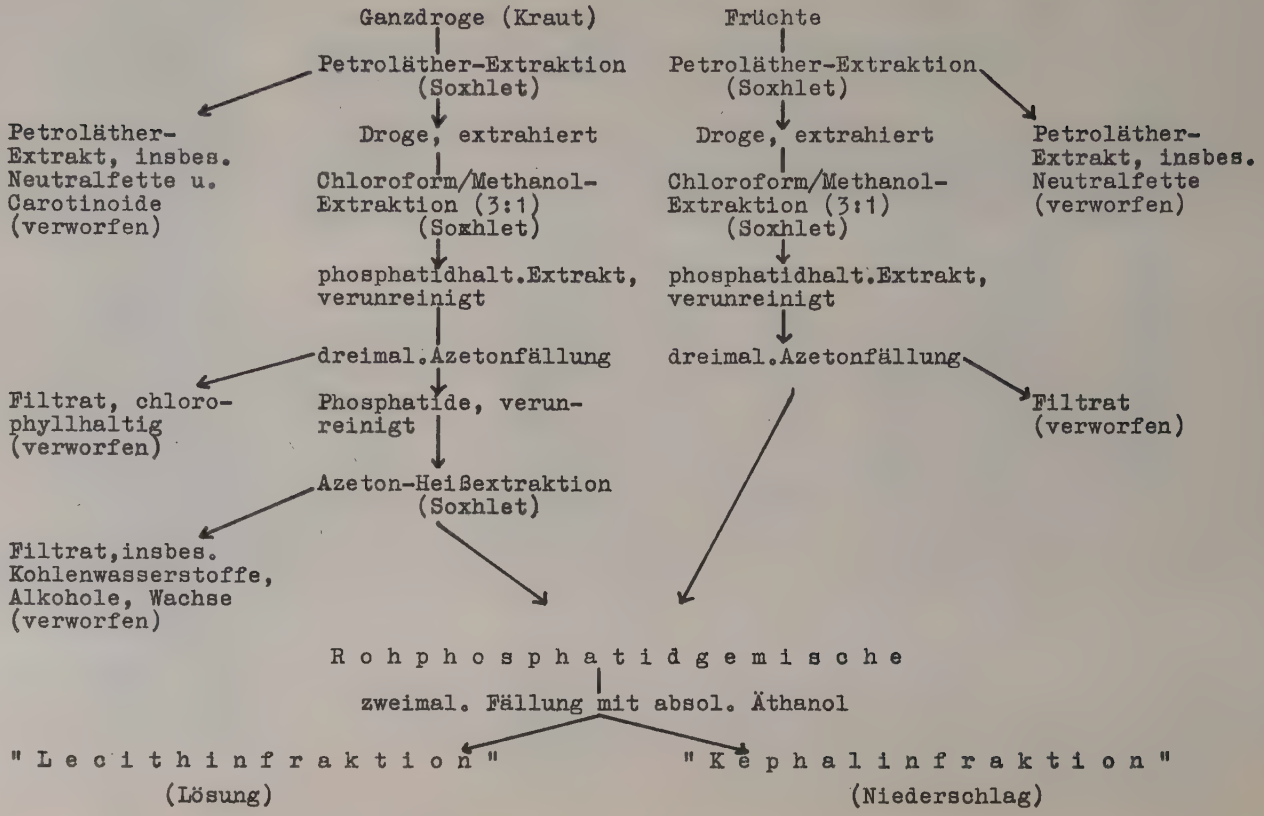
104) N.FREINKEL, Biochem.J. 68, 327 (1958)
105) G.HILLMANN, "Biosynthese und Stoffwechselwirkungen der Schilddrüse", Stuttgart 1961, S. 77
106) L.ABELIN u. P.KÜRSTEINER, Biochem.Z. 198, 19 (1928)
107) J.FOLCH, J.biol.Chemistry, 146, 35 (1942)
108) H.DEBUCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 304, 109 (1956)
109) C.H.BRIESKORN u. H.HERRIG, Arch.Pharm.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 485 (1959)

ihrer Entfernung führten wir analog CHIBNALL und CHANNON[110] eine Azetonheißextraktion durch. Die Verunreinigungen gingen hierbei in Lösung, während die Hauptmenge der Phosphatide ungelöst zurückblieb. Die weitere Auftrennung der Gemische in eine "Lecithin"- und "Kephalinfraktion" erfolgte nach der üblichen Chloroform-Alkoholmethode von DEBUCH[111]. Nach zweimaliger Umfällung aus Chloroform-Alkohol erhielten wir aus den Früchten 0.082%, aus der Ganzdroge 0.057% "Kephalinfraktion".

Der Isolierungsgang ist auf Seite 37 schematisch dargestellt.

110) A.C.CHIBNALL u. H.J.CHANNON, Biochem.J. 21, 225 (1927)
111) H.DEBUCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 304, 109 (1956)

Schematische Darstellung der Phosphatidanreicherungen



II. Untersuchung der Phosphatidfraktionen

Die erhaltenen "Lecithinfraktionen" untersuchten wir wegen der geringen Substanzmengen nur papier- und dünnschichtchromatographisch, die Kephalinfraktionen beider Drogenteile zusätzlich durch quantitative Bestimmungen, alkalische und saure Hydrolysen der Gesamtgemische. Mittels Papierchromatographie auf einem Formaldehyd-imprägnierten Papier[112] mit dem Laufmittelsystem Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) konnten wir in den "Kephalinfraktionen" beider Gemische nach stufenweisem Anfärben mit Ninhydrin[113], Phosphormolybdänsäure[114] und Rhodamin B[115], sowie mit Nilblau[116] und Ammoniummolybdat-Perchlorsäure[117] folgende Verbindungen nachweisen (vgl. Abbildung 7):

Phytoglycolipid	(PGL)	R_f 0.16 - 0.22
Monophosphoinositid	(MPI)	R_f 0.40 - 0.45
Phosphatidylserin	(PS)	R_f 0.50 - 0.55
Phosphatidyläthanolamin	(PÄ)	R_f 0.70 - 0.77

Phosphatidylserin konnten wir lediglich in den Früchten auffinden. Wahrscheinlich war die Konzentration in der Ganzdroge zu gering, um chromatographisch nachweisbar zu sein. In den "Lecithinfraktionen" überwog das Phosphatidylcholin (Lecithin oder PCH) R_f 0.70 - 0.80.

---

112) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)
113) R.J.CONSDEN, A.H.GORDON u. A.J.P.MARTIN, Biochem.J. 38, 224(1944)
114) L.DOUSTE-BLAZY, J.POLONOVSKI u. P.VALDIGUIE, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 235, 1643 (1952); ref. C.A. 47, 5981 (1953)
115) G.V.MARINETTI u. E.STOTZ, J.Amer.chem.Soc. 77, 6668 (1955)
116) M.H.HACK, Biochem.J. 54, 602 (1953)
117) C.S.HANES u. F.A.ISHERWOOD, Nature 164, 1107 (1949)

Papierchromatographie der "Kephalinfraktionen" aus Früchten und Ganzdroge von Lithospermum officinale

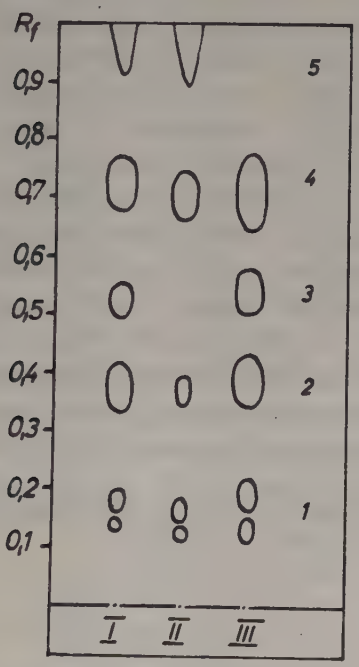


Abb. 7

I = aus Früchten
II = aus Ganzdroge
III = Testsubstanzen

1 = Phytoglycolipid
2 = Monophosphoinositid
3 = Phosphatidylserin
4 = Phosphatidyläthanolamin
5 = Neutralfett

System: Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) aufsteigend auf Formaldehyd-imprägniertem Papier
Anfärbereagens: Nilblaulösung

D ü n n s c h i c h t c h r o m a t o g r a p h i s c h e Untersuchungen führten wir nach WAGNER und Mitarbeitern[118] auf Kieselgelplatten mit dem Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) durch. Die Prüfungen bestätigten das bereits papierchromatographisch erhaltene Ergebnis. Die Anfärbung erfolgte stufenweise durch Besprühen mit Ninhydrinlösung (I), Dragendorff-Reagens (II) und Ammoniummolybdat-Perchlorsäure (III), wobei, wie in Abb. 8 dargestellt, nach dem Besprühen mit I Aminosäuren und Phosphatidyläthanolamin, nach II Phosphatidylcholin und nach III zusätzlich Monophosphoinositid sichtbar wurden. Sämtliche Phosphatide, mit Ausnahme des Monophosphoinositids, ergaben scharfbegrenzte Flecken. Die "Kephalinfraktion" aus Früchten zeigte außerdem zwei nahe beieinander liegende Flecken (R_f = 0.72), die auf Grund ihrer charakteristischen Lage oberhalb von Phosphatidyläthanolamin den C e r e b r o s i d e n zugeordnet werden dürfen. Phosphatidylserin und Phytoglycolipid sind mit dieser Methode nicht nachweisbar.

Dünnschichtchromatographie von Phosphatidgemischen aus Lithospermum officinale

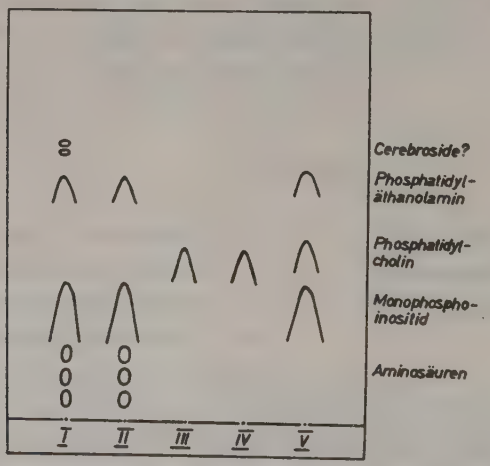


Abb. 8

I = "Kephalinfraktion" aus Früchten
II = "Kephalinfraktion" aus Ganzdroge
III = "Lecithinfraktion" aus Früchten
IV = "Lecithinfraktion" aus Ganzdroge
V = Testsubstanzen

Laufmittelsystem:
Chloroform/Methanol/
Wasser (65:25:4)

118) H.WAGNER, L.HÖRHAMMER u.P.WOLFF, Biochem.Z.334, 175 (1961)

Um annähernd quantitative Aussagen über den Gehalt an o r g a n i s c h g e b u n d e n e m P h o s p h o r machen zu können, bestimmten wir nach LISSAU[119] ohne Hydrolyse der Phosphatidgemische den Gehalt an Gesamtphosphor und anorganisch gebundenem Phosphor, woraus sich als Differenz der organisch gebundene Phosphor ergibt. Da die Papierchromatographie nur schwache Phosphatidnachweise erbracht hatte, führten wir mit den Gemischen Gesamtphosphorbestimmungen durch und verzichteten auf Einzelbestimmungen von papierchromatographisch getrennten Phosphatidflecken. Dagegen nahmen wir die Bestimmung des anorganischen Phosphors nach papierchromatographischer Trennung vor. Anorganisches Phosphat wird hierbei in Startpunktnähe festgehalten und läßt sich infolge der nach Besprühen mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure auftretenden Gelbfärbung leicht vom blau gefärbten, organischen Phosphat unterscheiden.

Unter Zugrundelegung eines durchschnittlichen Molekulargewichts von 700 - 800 und eines Phosphorgehalts von ca. 4% ergeben sich aus den in Tabelle 5 dargestellten Werten Phosphatidgehalte von ca. 67% (Früchte) bzw. 6% (Ganzdroge).

T a b e l l e 5

Phosphorgehalt der "Kephalinfraktionen" aus Lithospermum officinale

Phosphatid-gemisch	P-Gehalt (%)		
	Gesamt-P	anorg. P	organ. P
aus Früchten	4.12	1.42	2.70
aus Ganz-droge	0.52	0.32	0.20

Die S t i c k s t o f f b e s t i m m u n g e n nach dem Mikro-Kjeldahl-Verfahren[120] ergaben die in Tabelle 6 dargestellten prozentualen Werte.

119) F.A.LISSAU, Dissertation, München 1960
120) I.K.PARNASS u. R.WAGNER, Biochem.Z. 125, 253 (1921)

Tabelle 6

Stickstoffgehalt der "Kephalinfraktionen" aus Lithospermum officinale

Phosphatidgemische	N-Gehalt (%)
aus Früchten	1.19
aus Ganzdroge	0.56

Da das P:N-Verhältnis bei Phosphatidfraktionen, die kein Sphingomyelin enthalten, etwa 1:1 beträgt, kann man aus den obigen Werten ableiten, daß das Gemisch aus den Früchten weitgehend rein, die Fraktion aus der Ganzdroge dagegen durch andere stickstoffhaltige Substanzen, insbesondere Aminosäuren, stark verunreinigt war.

Zur Sicherung der obigen Angaben hydrolysierten wir die Phosphatidfraktionen und prüften papierchromatographisch auf die entstandenen Spaltprodukte. Zum Nachweis der Aminosäuren eignete sich die durchlaufende Methode mit Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5). Anhand von Testsubstanzen wiesen wir in beiden Phosphatidgemischen Äthanolamin und Glucosamin nach. Außerdem zeigte sich im Durchlaufchromatogramm wenig unterhalb von Äthanolamin ein ninhydrinpositiver Fleck, der zugleich eine Reaktion auf organisch gebundenes Phosphat ergab. Es dürfte sich um Äthanolaminphosphat handeln. Zur Prüfung auf Inosit und Kohlenhydrate als charakteristische Spaltprodukte von Inositphosphatiden und des Phytoglycolipids entsalzten wir die sauren Hydrolysate mit Amberlite IR-120 und Amberlite IRA-400 und chromatographierten in den Systemen Isopropanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) (I) und Pyridin/Äthylazetat/Wasser (2:7:1) (II). Beide Gemische enthielten Inosit. Zur Prüfung auf reduzierende Zucker war lediglich System II verwendbar. Im Durchlaufchromatogramm beider Gemische fanden wir Glucosamin, Galactose und Glucose, in der "Kephalinfraktion" aus Ganzdroge zusätzlich Arabinose. Diese Spaltprodukte entstammen dem Phytoglycolipid.

Nachdem bereits im Glyceridanteil der Früchte neben gesättigten Fettsäuren auch Polyensäuren aufgefunden wurden, prüften wir auch den Phosphatidanteil auf das Vorhandensein von F e t t s ä u r e n . Nach alkalischer Hydrolyse erhielten wir aus den Früchten 30.8% (A) und aus der Ganzdroge 4.5% Fettsäuren (B) als bräunliche, halbfeste Massen. Während die Papierchromatographie von A neben geringen Mengen S t e a r i n s ä u r e auch Ö l - , L i n o l - , L i n o l e n - und eine hoch ungesättigte Fettsäure mit dem R_f-Wert der C_{18} - T e t r a e n s ä u r e ergab, konnte aus B nur P a l m i t i n s ä u r e erhalten werden. Die A l k a l i - I s o m e r i s i e r u n g von A bestätigte das Ergebnis der Papierchromatographie (vgl. Abbildung 9).

Alkali-Isomerisierung der Phosphatidfettsäuren aus den Früchten (A)

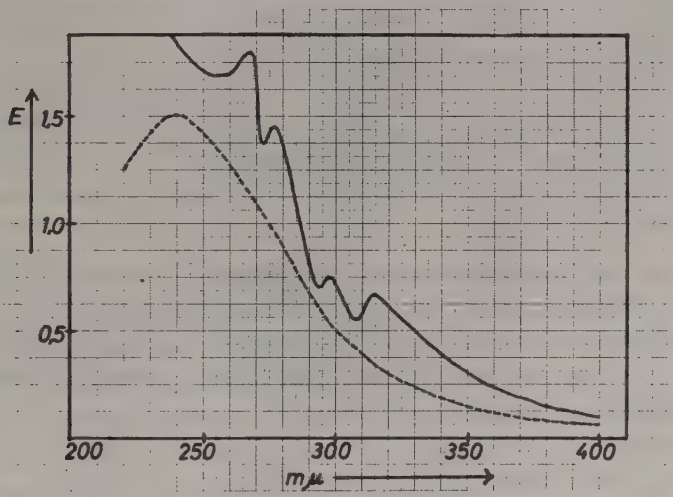


Abb. 9

------- = vor Isomerisierung
——————— = nach Isomerisierung

Die UV-Absorptionsmaxima bei 268, 276 - 278, 298 und 314 mμ bestätigten durch den in Richtung zum langwelligeren Bereich steil abfallenden Kurvenverlauf sowohl die Anwesenheit

von Dien- und Triensäure als auch einer bereits im Glyceridanteil gefundenen T e t r a e n s ä u r e . In Verbindung mit den papierchromatographischen Ergebnissen müssen demnach die beschriebenen Fettsäuren der C_{18} - R e i h e angehören. Diese Untersuchungen zeigen, daß sich die Hauptmenge der Polyene von Lithospermumfrüchten, unter ihnen die Octadecatetraensäure, nicht im Phosphatidanteil sondern in der Neutralfettfraktion befinden.

H. Versuche zur Gewinnung einer Saponin- bzw. Gerbstoffraktion und Isolierung eines Inositisomeren aus der Ganzdroge von Lithospermum officinale L.

Wie bei den Voruntersuchungen in den Kapiteln "Prüfung auf Saponine" und "Prüfung auf Gerbstoffe" erwähnt, erhielten wir aus dem Methanolextrakt der Ganzdroge auf Zusatz von absolutem Äthanol einen gut wasserlöslichen Niederschlag, der papierchromatographisch nicht einheitlich war. Wir vermuteten das Vorhandensein von Saponinen und Gerbstoffen. Außerdem enthielt das Gemisch eine in der Hitze reduzierende Substanz.

I. Prüfung auf Saponine

Zur Prüfung auf Saponine untersuchten wir das durch Fällen mit absolutem Äthanol erhaltene Substanzgemisch zunächst orientierend mit Hilfe der P a p i e r c h r o m a t o g r a p h i e im System Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:2)[121], wobei mehrere im UV-Licht blau fluoreszierende Flecken mit den R_f-Werten 0.29, 0.45 und 0.63 auftraten. Wir erhielten nach Behandeln der Chromatogramme mit Antimontrichlorid-Lösung[122] bei R_f = 0.63 eine blaue und bei R_f = 0.74 zusätzlich eine grüne UV-Fluoreszenz, jedoch verlief der Hämolysetest[123] negativ. Auch die durchgeführten chemischen S a p o n i n r e a k t i o n e n , wie Hämolyseversuch[124], Liebermann-

121) N.L.DUTTA, Nature (London) 175, 85 (1955)
122) E.MERCK AG., "Chromatographie", Darmstadt, S. 149
123) W.BUTZ, Pharmac.Acta Helvetiae 20, 296 (1945)
124) R.KOBERT, Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 23, 259 (1887)

Burchard-Reaktion[125] und Cholesterinfällung[126], waren ergebnislos. Lediglich die Molischprobe[127] und die Eisenchloridreaktion waren als positiv zu betrachten. Die papierchromatographische P r ü f u n g auf S a p o g e n i n e , die nach alkalischer Hydrolyse[128] aus dem ätherlöslichen Anteil erfolgte, zeigte kein Ergebnis. Dagegen ergab die Prüfung auf f r e i e Z u c k e r aus dem wässrigen Teil eines sauren Hydrolysates[129] eine deutlich positive Reaktion.

II. Prüfung auf Gerbstoffe

Durch Gelatinefällung, Bromwasserprobe (auf Catechine), Cyanidreaktion (auf Gallussäure), Griessmayer-Reichel-Reaktion (auf Ellagsäure), Reaktion auf gebundene Ellagsäure, Fichtenspan-Salzsäure-Reaktion (auf Catechine und Phloroglucin) sowie durch die für Gemische aus Gallotanninen und Catechinen differenzierende Bleiazetatfällung und die Formaldehyd-Salzsäureprobe[130] wiesen wir nach, daß im Gemisch sowohl nicht hydrolysierbare Catechine als auch hydrolysierbare Gerbstoffe des Gallussäuretyps vorhanden waren. Nach den Hydrolysenergebnissen muß das Gemisch hauptsächlich aus Catechinen bestanden haben. Die Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums mit einem charakteristischen Maximum bei 280 mμ weist in die gleiche Richtung.

Eine nähere Untersuchung nahmen wir nicht vor. Sie wird jedoch wegen einer eventuellen antihormonalen Wirksamkeit Gegenstand späterer Prüfungen sein müssen.

---

125) C.H.BRIESKORN u. H.HERRIG, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz. Ges. 292/64, 485 (1959)
126) A.STOLL u. E.JUCKER in PAECH-TRACEY, "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd.III, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 182
127) R.BRIEGER in G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. I, Wien 1931, S. 581
128) R.E.MARKER, R.B.WAGNER, P.R.ULSHAFER, E.L.WITTBECKER, D.P.J. GOLDSMITH u. C.H.RUOF, J.Amer.Chem.Soc. 69, 2167 (1947)
129) LETTRE-INHOFFEN-TSCHESCHE, "Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe", Stuttgart 1954, S. 214
130) O.TH.SCHMIDT in PAECH-TRACEY, "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd.III, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 517

III. Untersuchung der unbekannten reduzierenden Substanz mit dem R_f-Wert 0.14 - 0.16 *)

Mit der Untersuchung und Klassifizierung des Gerbstoffgemisches war die Herkunft der in allen Chromatogrammen tiefsitzenden, reduzierenden Substanz noch nicht geklärt. Nach A z e t y l i e r u n g des P r ä z i p i t a t s mit Essigsäureanhydrid und Natriumazetat auf dem Wasserbad erhielten wir aus methanolischer Lösung in sehr geringen Mengen nadelförmige Mikrokristalle mit einem Schmelzintervall von 235 - 245°. Wie spätere Schmelzpunktsbestimmungen zeigten, war das Kristallisat noch stark verunreinigt. Azetylierungsversuche mit Essigsäureanhydrid und Pyridin in der Kälte scheiterten an der Unlöslichkeit des Gemisches in Pyridin. Nach Azetylierung mit Essigsäureanhydrid und Natriumazetat bei 130° erhielten wir wiederum geringe Kristallmengen, die diesmal einen höheren Schmelzpunkt (260 - 270°) besaßen. Da eine Verbesserung der Azetatausbeute weder durch Einengen der Lösung noch durch mehrfache Behandlung mit Aktivkohle zu erreichen war, reinigten wir die Substanz durch Chromatographie an Magnesiumtrisilikat "Woelm", wobei die stark gefärbten Verunreinigungen teilweise in der obersten Zone der Säule fest adsorbiert blieben.

Wir erhielten 1.26% eines Kristallisates, das nunmehr in Methanol schwerlöslich und in anderen organischen Solventien praktisch unlöslich war. Die Umkristallisation aus Methanol ergab reines Azetat vom Schmelzpunkt 289°. Nach Verseifung konnten wir papierchromatographisch im System Isopropanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) einen einzigen reduzierenden Fleck nachweisen, der in seinem R_f-Wert von 0.14 - 0.16 und im Reduktionsvermögen mit authentischem m-Inosit übereinstimmte. Die E l e m e n t a r a n a l y s e des Azetates (49.39% C und 5.64% H) stimmte tatsächlich auf ein Inosithexaazetat (50.00% C und 5.59% H). Die gefundenen CH_3CO-Werte (50.88%) waren allerdings nur mit einem Inosittetraazetat (49.42%) in Übereinstimmung zu bringen. Keine

*) Laufmittel: Isopropanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1)

Übereinstimmung zeigte aber der Schmelzpunkt. Inosithexaazetat schmolz bei 212° und damit weit unter dem für unser Azetat ermittelten Wert von 289°. Auch die in der Literatur für Inositazetat angegebene Kristallform traf nicht zu. Wir erhielten in wasserfreiem Lösungsmittel hexagonale Nadeln und Prismen, während m-Inosithexaazetat als Anhydrat in Form von rhombischen Plättchen vorliegen soll.

Somit schied Inosithexaazetat für diese Substanz aus.

Da inositähnliche Stoffe, auch Cyclite genannt, infolge sterischer Hinderung[131] oft nur unter sehr energischen Versuchsbedingungen vollständig azetyliert werden, vermuteten wir zunächst das Vorliegen eines nur teilweise azetylierten Inosits, zumal die genannten CH_3CO-Werte auf ein Tetraazetat hinwiesen. Authentisches m-Inosit, das nach unseren Versuchsbedingungen azetyliert wurde, hatte jedoch den Literaturschmelzpunkt von 212°. Ferner konnten wir auf Grund der in der Literatur angegebenen Schmelzpunkte für teilweise azetylierte Cyclite die allgemeine Regel ableiten, daß bei abnehmender Zahl von Azetylgruppen auch die Schmelzpunkte stark erniedrigt sind. Beispielsweise besitzt m-Inosittriazetat einen Schmelzpunkt von 71°. Nach den Ergebnissen einer qualitativen Elementaranalyse, die die Abwesenheit weiterer Elemente außer C, H und O gezeigt hatte, schieden auch Inositphosphorsäuren aus. Es lag daher nahe, ein isomeres Inosithexaazetat anzunehmen, zumal das I R - S P E K T R U M des unbekannten Azetates, das im wesentlichen durch die Esterbande bei 1754 cm^{-1} und die C-O-C-Valenzschwingungen bei 1227 und 1370 cm^{-1} charakterisiert war, mit dem des m-Inositazetates (vgl. die Abb. 10 und 11) weitgehende Übereinstimmung zeigte. Lediglich im Bereich der C=O-Valenzschwingungen zwischen 1036 und 1220 cm^{-1} sowie bei den Gerüstschwingungen zwischen 870 und 1000 cm^{-1} traten Unterschiede auf.

---

131) S.J.ANGYAL, Quart.Rev. (chem.Soc.,London) 11, 212 (1957)

IR-Spektrum des unbekannten Azetates

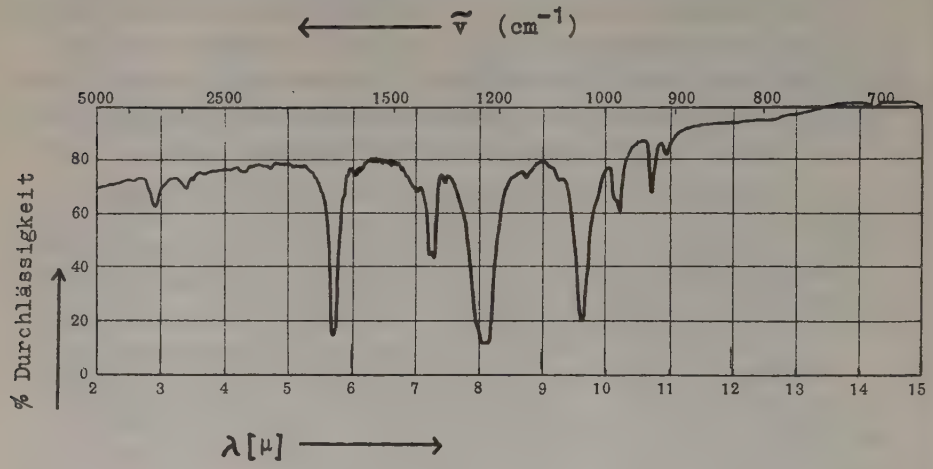


Abb. 10

IR-Spektrum von authentischem m-Inositazetat

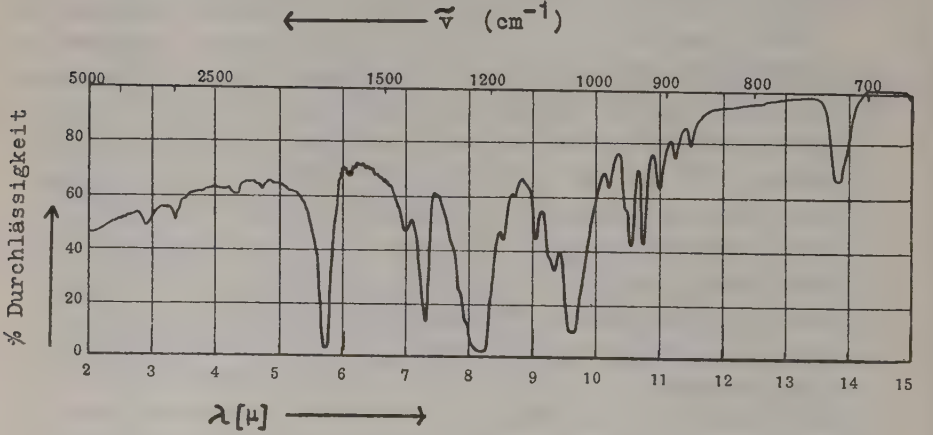


Abb. 11

Die Schmelzpunkte der in der Literatur beschriebenen Cyclite liegen durchweg zwischen 190 und 250°, die Azetatschmelzpunkte oft bedeutend niedriger.

Eine Ausnahme ist das Scyllit, das sowohl in freiem Zustand (Literaturangaben je nach Kristallisationsbedingungen zwischen 345 - 355°) als auch in azetylierter Form (288 - 300°) einen extrem hohen Schmelzpunkt besitzt. Auch in den Löslichkeitseigenschaften unterscheidet sich Scyllitazetat infolge seiner Schwerlöslichkeit in Methanol und fast völligen Unlöslichkeit in anderen organischen Solventien von den übrigen Cyclitazetaten, die in Methanol mäßig bis gut löslich sind.

Sowohl im Schmelzpunkt als auch in der Methanollöslichkeit würde das von uns dargestellte Azetat mit Scyllitazetat übereinstimmen.

Da für die Verseifung und Kristallisation nur wenig Substanz übriggeblieben war, versuchten wir, das freie Cyclit aus der Ganzdroge zu isolieren.

IV. Isolierung und Identifizierung des freien Inositisomeren

In neuerer Zeit isolierten ROWE, HARWOOD und MYERS[132] aus Vernonina altissima NUTT. die drei Cyclite m-Inosit, Scyllit und l-Inosit nach einem Analysengang, der sich der Fällung mit neutralem und basischem Bleiazetat, der Austauschchromatographie und der fraktionierten Kristallisation bedient.

Die beschriebene Methode ließ sich auf unsere Droge übertragen. Allerdings erforderte der hohe Kohlenhydratgehalt des Extraktes eine gewisse Abänderung der Kristallisationsmethode. Zur I s o l i e r u n g extrahierten wir die Droge mit kaltem Wasser und versetzten den abgepreßten Extrakt mit gesättigter Bleiazetatlösung bis zur quantitativen Fällung. Nach Einengen des Filtrats entstand auf Zugabe von basischer Bleiazetatlösung erneut ein Niederschlag. Nach dem Eindicken der überstehenden Lösung entsalzten wir das Konzentrat mit Amber-

132) E.J.ROWE, A.A.HARWOOD u. D.B.MYERS, J.Amer.pharmac.Assoc.,sci. Edit. 44, 308 (1955)

lite IR-120 und Amberlite IRA-400 und brachten es im Vakuum zur Sirupkonsistenz.

Der gewonnene Extrakt enthielt, wie die papierchromatographische Verfolgung der einzelnen Isolierungsstadien mit dem System Isopropanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) zeigte, neben mehreren reduzierenden Zuckern auch einen Stoff, der inositähnliches Verhalten besaß (R_f = 0.14 - 0.16). Durch fraktionierte Kristallisation aus 70%igem Äthanol unter Zusatz einiger Tropfen Äther erhielten wir drei cyclithaltige Fraktionen in kristalliner Form. Die Umkristallisation konnte, da die Substanz nur mäßig wasserlöslich war, aus reinem Wasser erfolgen. Nach der dritten Reinigung erhielten wir 0.03% eines Kristallisates von monokliner Form und konstantem Zersetzungspunkt bei 350°. Dieser Schmelzpunkt ist in der Literatur auch für Scyllit angegeben.

Zu Vergleichszwecken isolierten wir in analoger Weise authentisches Scyllit aus Eicheln, worin es im Gemisch mit dem Pentahydroxycyclohexanderivat Quercit vorliegt[133]. Sein Schmelzpunkt betrug 349°.

In der nachfolgenden Tabelle 7 sind die R_f-Werte der papierchromatographisch verglichenen Cyclite unter Verwendung verschiedener Laufmittelsysteme einander gegenübergestellt. Infolge der geringen R_f-Unterschiede blieben Auftrennungsversuche ergebnislos.

T a b e l l e 7

Vergleichende papierchromatographische Untersuchung des unbekannten Cyclits mit isoliertem Scyllit und authentischem m-Inosit

Laufmittelsysteme	R_f-Werte		
	Cyclit(Lithosp.)	Scyllit(Eicheln)	m-Inosit
Isopropanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1)	0.14 - 0.16	0.15 - 0.17	0.15 - 0.16
Äthylazetat/Pyridin/Wasser (7:2:1)	0.10	0.10	0.10
Azeton 95%ig[134]	0.13 - 0.15	0.13 - 0.15	0.16

133) C.VINCENT u. D.DELACHANAL, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 104, 1855 (1887)
134) C.E.BALLOU u. A.B.ANDERSON, J.Amer.Chem.Soc. 75, 648 (1953)

Zur Klärung der Frage, welcher Stoffklasse die isolierte Substanz zuzuordnen ist, führten wir einige c h e m i s c h e I n o s i t r e a k t i o n e n durch. Diese beruhen auf Farbreaktionen zwischen Metall- insbesondere Erdalkaliionen und der bei energischer Oxydation von Cycliten gebildeten Rhodizonsäure. Wir führten mit den aus Lithospermum officinale und aus Eicheln isolierten Substanzen und mit authentischem m-Inosit den Scherer-Test[135] und die auch für kleinste Substanzmengen empfindliche Probe nach FISCHER-KÜRTEN[136] durch. Bei gleichen Konzentrationen ergab m-Inosit in beiden Versuchen eine stark positive, die beiden isolierten Cyclite eine schwache, jedoch deutlich sichtbare Farbreaktion. Die C H - W e r t e von freiem sowie bei 130° in beschriebener Weise azetyliertem Cyclit stimmten mit den für ein Hexahydroxycyclohexan bzw. Hexahydroxycyclohexanhexaazetat errechneten Werten überein, so daß mit Sicherheit ein nichtsubstituiertes Inositisomeres angenommen werden darf. Die S c h m e l z - und M i s c h s c h m e l z p u n k t e lagen konstant bei 290 - 293° für das Azetat und bei 345 - 350° für die freie Form. Die Mischschmelzpunkte stellten einen ersten Beweis für das Vorliegen von Scyllit dar. Durch Aufnahme von I R - S p e k t r e n wurde diese Annahme erhärtet. Wie in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt, zeigen die Überlagerungsspektren des aus Lithospermum officinale isolierten Cyclits mit dem aus Eicheln isolierten Scyllit sowie deren Azetate völlige Übereinstimmung. Diese Identität ist neben Schmelzpunkt, Azetat und CH-Werten für die Beweisführung entscheidend. Ferner demonstrieren die beiden Spektren die Unterschiedlichkeit zu denen von m-Inosit[137] bzw. m-Inositazetat (vgl. Abbildung 11).

---

135) J.SCHERER, Liebigs Ann.Chem. 81, 375 (1855)
136) F.FISCHER u. F.H.KÜRTEN, Biochem.Z. 254, 138 (1932)
137) H.BERBERICH, Dissertation, München 1961

IR-Überlagerungsspektrum von unbekanntem Cyclit mit authentischem Scyllit

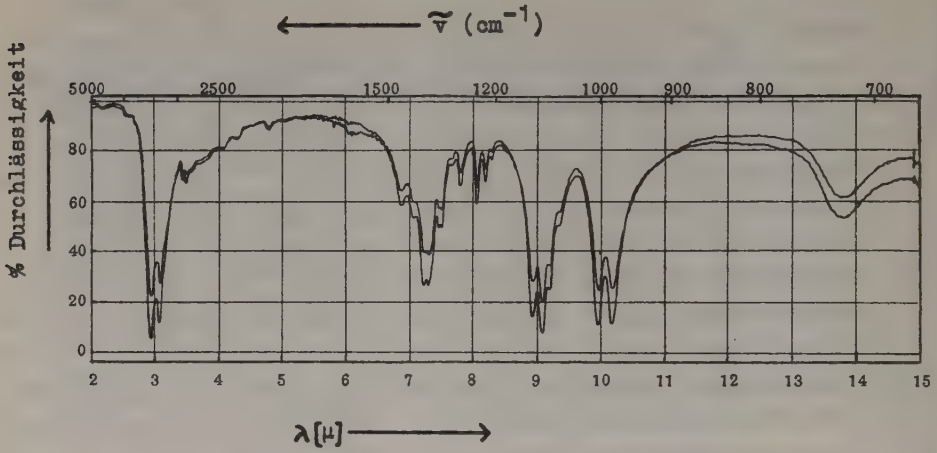


Abb. 12

IR-Überlagerungsspektrum von unbekanntem Cyclitazetat mit authentischem Scyllitazetat

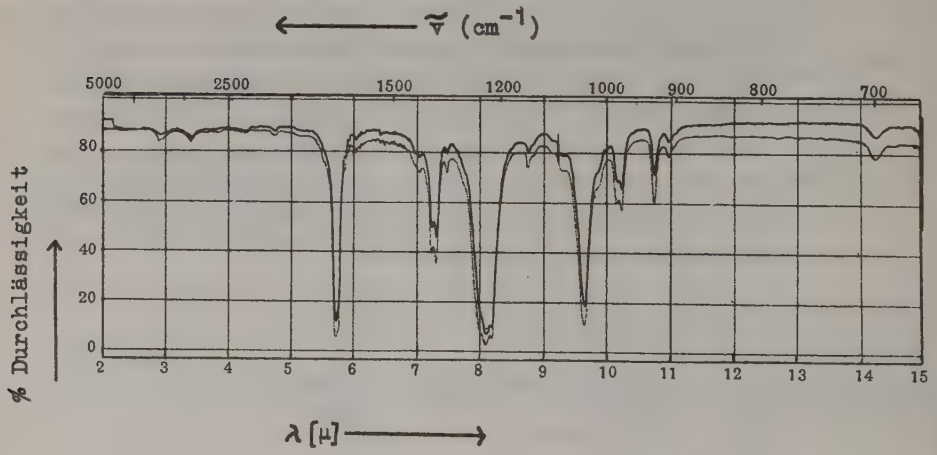


Abb. 13

Abschließend nahmen wir eine v e r g l e i c h e n d e P e r j o d s ä u r e t i t r a t i o n vor. Zur Unterscheidung cis- oder trans-vicinaler OH-Gruppen bei Cycliten kann die Oxydation mit Perjodsäure herangezogen werden. Zwar ist der Perjodsäureverbrauch isomerer Inosite bei vollständiger Oxydation gleich groß, doch bestehen kinetische Unterschiede, je nach Stellung der OH-Gruppen. So wird Scyllit anfangs langsamer oxydiert als m-Inosit. Abbildung 14 zeigt die unterschiedliche Kinetik der Oxydation von m-Inosit und dem aus Lithospermum officinale isolierten Isomeren.

Der molare Perjodatverbrauch, zu verschiedenen Zeiten gemessen, entspricht annähernd den von POSTERNAK[138] für Scyllit und m-Inosit gefundenen Werten.

Schematische Darstellung der vergleichenden Perjodsäuretitration von m-Inosit und unbekanntem Cyclit aus Lithospermum officinale

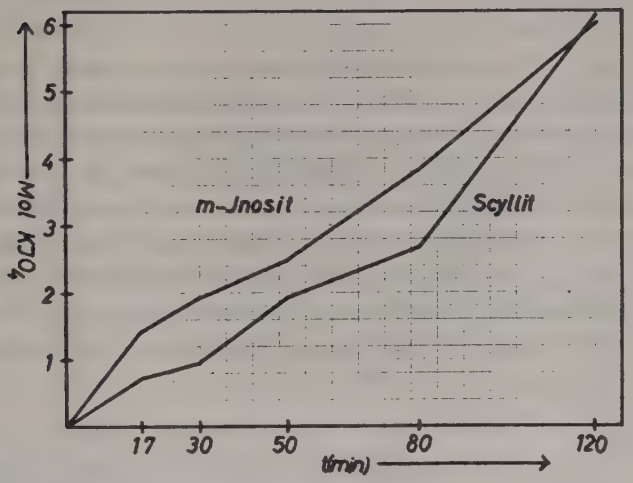
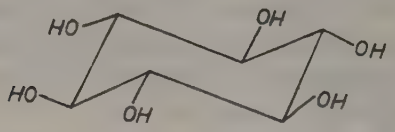


Abb. 14

138) TH.POSTERNAK, Helv.chim.Acta 24, 1045 (1941)

Ergebnis der Identifizierungsversuche

Die Gesamtheit der durchgeführten Identifizierungsreaktionen beweist eindeutig, daß S c y l l i t in Lithospermum officinale vorhanden ist.



Scyllit wurde erstmals von VINCENT und DELACHANAL[139] aus Eicheln isoliert. Diese Verbindung, auch als Quercinit bezeichnet, wurde in der Folgezeit vereinzelt aus tierischen und pflanzlichen Organen isoliert, z.B. aus Cocosarten (Cocosit)[140], aus den Blüten von Cornus florida L.[141] und aus Organen von Haifischen und Rochen[142]. Die Strukturaufklärung erfolgte 1942 durch POSTERNAK[143].

Auch in Lithospermumarten kommen isomere Inosite vor. BIEN und GINSBURG[144] isolierten und identifizierten aus Lithospermum purpureo-coeruleum L. Bornesit, einen Inositmonomethyläther. Das gleiche Cyclit wurde von PLOUVIER[145] auch in Lithospermum officinale L. aufgefunden. Daß das von uns isolierte Inositisomere hiermit nicht identisch sein kann, ergab sich sowohl aus den angeführten Beweisen als auch aus dem negativen Verlauf einer Methoxylgruppenbestimmung. Wir fanden einen CH_3O-Wert von 0.88% gegenüber dem für Bornesit errechneten von 15.98%.

139) C.VINCENT u. D.DELACHANAL, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 104, 1855 (1887)
140) H.MÜLLER, J.chem.Soc. (London) 91, 1009, 1176 (1907); 101, 2383, 2386 (1912)
141) C.E.SANDO, K.S.MARKLEY u. M.B.MATLACK, J.biol.Chemistry 68, 399 (1926)
142) G.STADELER u. F.G.FRERICHS, J.prakt.Chem. 73, 48 (1887)
143) TH.POSTERNAK, Helv.chim.Acta 25, 746 (1942)
144) S.BIEN u. D.GINSBURG, J.chem.Soc. (London) 3189 (1958)
145) V.PLOUVIER, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 247, 2190 (1958)

I. Untersuchung von Aminosäure- und Peptidfraktionen aus der Ganzdroge von Lithospermum officinale L.

Auf die Möglichkeit, daß Aminosäuren und Peptide den Stoffwechsel der Schilddrüse im Sinne einer Verstärkung bzw. Abschwächung der Thyroxinwirkung beeinflussen können, wird in der Literatur des öfteren hingewiesen[146)147)148)].

Von Bedeutung erscheint weiterhin die von FITTING[149)] festgestellte Tatsache, daß für die Wirksamkeit der Aminosäuren nicht nur eine untere, sondern auch eine obere Dosierungsgrenze besteht, eine Beobachtung, die bei der pharmakologischen Prüfung antithyreotrop wirksamer Pflanzen wie Lycopus- und Lithospermumarten des öfteren gemacht wurde[150)151)].

I. Aminosäuren.

Zur Herstellung eines aminosäurehaltigen Extraktes fraktionierten wir einen aus trockener Ganzdroge kalt bereiteten wässrigen Auszug über eine Amberlite IR-120-Säule nach der Methode von VIRTANEN[152)]. Erfahrungsgemäß treten bei beginnender alkalischer Reaktion des ausfließenden Eluats die Aminosäuren ohne Fraktionierung in der Vorlage auf. Den im Vakuum eingeengten Extrakt verwendeten wir direkt zur papierchromatographischen Untersuchung. Nach absteigender P a p i e r c h r o m a t o g r a p h i e in Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) und nach Besprühen mit Ninhydrinlösung traten 6 Flecken auf. Im Durchlaufchromatogramm zeigten sich 2 weitere Flecken. Mittels zweidimensionaler Chromatographie in den Systemen Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) und Phenol 80%ig wurden zwar 2 weitere Flecken sichtbar, aber auch hier war der Trenneffekt, wie spä-

146) M.BERGMANN, Klin.Wschr. 38, 1569 (1932)
147) C.AEHME, Klin.Wschr. 48, 1770 (1936)
148) TH.BERSIN, "Biochemie der Hormone", Leipzig 1959, S. 110
149) H.FITTING, Naturwissenschaften 21, 489 (1933)
150) R.F.WEISS, "Lehrbuch der Phytotherapie", Stuttgart 1960, S.330
151) F.KEMPER, Arzneimittel-Forsch. 9, 368, 411 (1959)
152) A.I.VIRTANEN, Angew.Chem. 67, 381 (1955)

tere chromatographische Untersuchungen zeigten, noch ungenügend. Insbesondere im unteren Teil der Chromatogramme traten teilweise Überlagerungen auf, die die Identifizierung erschwerten.

Zur Auftrennung der Aminosäuren mit niedrigem und mittlerem R_f-Wert wandten wir eine Technik an, die sich aus zweidimensionaler und wiederholter Chromatographie[153] zusammensetzt: Wir chromatographierten das Gemisch in 4 verschiedenen Laufmittelpaaren zweidimensional-absteigend (vgl. Experimenteller Teil). In jeder Laufrichtung arbeiteten wir wiederholt im Durchlauf über einen Zeitraum von 48 - 60 Stunden mit gleichen Lösungsmittelsystemen. Lediglich mit 80%igem Phenol als Laufmittelpaarling erwies sich die einfache aufsteigende Methode über ca. 40 cm als ausreichend.

Als bestes Laufmittelpaar erwies sich Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) und Phenol 80%ig, da ein Großteil der Aminosäuren in diesen Systemen beträchtliche R_f-Differenzen besitzt (vgl. Abbildung 15). Die papierchromatographische Identifizierung erfolgte zunächst für alle Aminosäuren mit Hilfe der sehr empfindlichen Ninhydrinreaktion[154]. Außerdem führten wir differenzierende Farbreaktionen durch. Neben der Isatinreaktion[155] erwies sich insbesondere die "Buntchromatographie" nach FOLIN, modifiziert nach MÜTING[156], als brauchbar. Letztere Reaktion ließ sich allerdings auf phenolhaltigen Chromatogrammen nicht ausführen. Auf diese Weise konnten wir papierchromatographisch identifizieren: Lysin, Histidin, Arginin, Asparaginsäure, Serin, Glycin, Glutaminsäure, Threonin, Alanin, Prolin, Valin und Leucin (oder Isoleucin?).

---

153) B.KEIL, Chem.Listy 48, 725 (1954)
154) R.J.CONSDEN, A.H.GORDON u. A.J.P.MARTIN, Biochem.J. 38, 224(1944).
155) J.BARROLIER, J.HEILMANN u. E.WATZKE, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 309, 219 (1957)
156) D.MÜTING, Naturwissenschaften 39, 548 (1952)

Zweidimensionale Papierchromatographie der Aminosäuren aus Lithospermum officinale

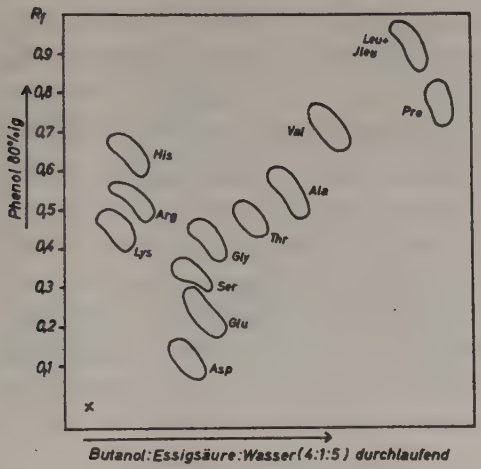


Abb. 15

Da das Vorkommen von Aminosäuren in Pflanzen nichts Außergewöhnliches darstellt, war es für uns von Interesse, ob das Gemisch einzelne Aminosäuren in starker Konzentration enthält. Diese Frage sollte durch eine q u a n t i t a t i v e A m i n o s ä u r e b e s t i m m u n g geklärt werden. Die Durchführung erfolgte in einer von HANNIG[157)*)] entwickelten Apparatur. Dieses Verfahren erfaßt die austauschchromatographisch getrennten Aminosäuren kontinuierlich und selbstregistrierend als symmetrische Gaußkurven. Im Elphor-Densitometer werden mittels Durchlaufküvette und Extinktionsschreiber die gemessenen Extinktionen bei 436 mμ für Prolin und bei 578 mμ für die übrigen Aminosäuren automatisch auf einen Papierstreifen eingestochen. Die Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte durch Vergleich mit einer in gleicher Weise chromatographierten Aminosäuretestmischung.

157) K.HANNIG, Clin.Chim.Acta 4, 51 (1959)
*) Wir danken Herrn Dr. K.Hannig vom Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München (Direktor: Professor Dr.W. Grassmann) für die Durchführung der Bestimmung.

Chromatogramm der freien Aminosäuren von 1.5 ml 10%igem wässrigem, entsalztem Lithospermumextrakt

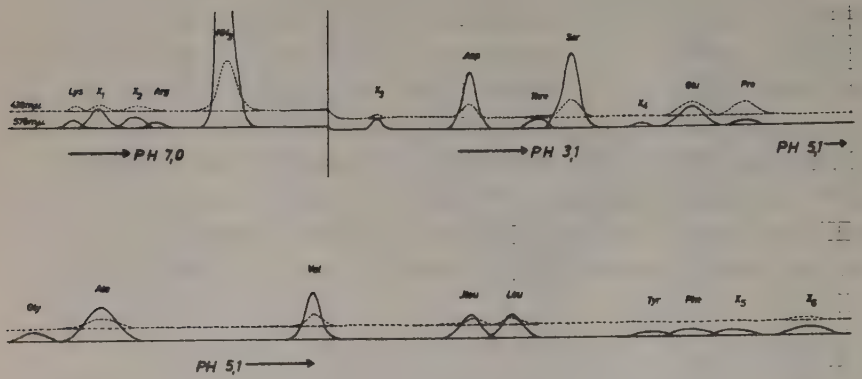


Abb. 16

T a b e l l e 8

Quantitative Bestimmung der freien Aminosäuren aus Lithosp.offic.

Aminosäuren	Test-Extinkt. (0.5 µM)	gemess.Extinkt. (1.5 ml)	Aminosäuren mg/%
Lysin	95	7	0.36
Arginin	80	5	0.36
Asparaginsäure	68	59	3.85
Threonin	69	10	0.57
Serin	69	94	4.77
Glutaminsäure	72	41	2.79
Prolin	20	22	4.22
Glycin	67	13	0.485
Alanin	69	66	2.84
Valin	76	46	2.37
Isoleucin	75	28	1.64
Leucin	76	30	1.72
Tyrosin	67	7	0.63
Phenylalanin	76	11	0.79
Ammoniak	13 (0.25 µM)	58	1.263

Wie Abbildung 16 zeigt, konnten auf Grund ihrer Lage im Chromatogramm außer Ammoniak 14 Aminosäuren erkannt werden. Papierchromatographisch wurde zusätzlich Histidin nicht aber Tyrosin und Phenylalanin aufgefunden. Der große Betrag an Ammoniak dürfte mit Sicherheit durch Reste der ammoniakhaltigen Elutionsflüssigkeit verursacht sein, die beim Einengen des Extraktes in Lösung verblieben waren.

Leucin und Isoleucin, die sich papierchromatographisch nur schwer trennen lassen, konnten nach dieser Methode ohne Überlappung als getrennte Kurven erhalten werden. Allerdings lassen sich einige Aminosäuren wie Glutamin und Tryptophan, die an stark sauren Austauscherharzen teilweise zerstört werden, nur schwer nachweisen. 6 "Peaks" (x_1 bis x_6) konnten auf diesem Wege nicht identifiziert werden. Entweder handelt es sich hierbei um selten vorkommende Aminosäuren oder aber um niedermolekulare Peptide, die sich bei der Austauschchromatographie wie Aminosäuren verhalten.

Die gefundene Gesamtkonzentration an freien Aminosäuren (0.026%) liegt im Vergleich zu anderen Ganzdrogen (0.02 - 0.2%) an der unteren Grenze. Als einzige Besonderheit ist der relativ hohe Gehalt an Asparaginsäure, Prolin und Serin zu erwähnen[158]. Es lag daher nahe, auch auf Peptide zu prüfen, zumal das Austauschchromatogramm unbekannte ninhydrinpositive Stoffe enthielt.

II. Peptide

Zur Herstellung eines Extraktes, der neben freien Aminosäuren auch niedermolekulare Peptide in nennenswerten Mengen enthalten kann, fraktionierten wir einen wässrigen Frischpflanzenauszug in beschriebener Weise nach VIRTANEN.

Wir hydrolysierten den Gesamtextrakt mit 6n-Salzsäure und verglichen die wässrige Lösung des im Vakuum getrockneten Rückstandes papierchromatographisch mit dem nicht hydrolysierten Auszug. Wir arbeiteten wegen der besseren Trennfähigkeit ausschließlich nach der durchlaufenden Methode ein- und zweidimen-

158) K.MANFORD u. R.RAPER, Nature (London) 174, 314 (1954)

sional und zogen zur Charakterisierung anstelle von R_f-Werten Testsubstanzen und spezifische Anfärbungen heran. Nach durchlaufender Chromatographie in Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) traten im unteren Chromatogrammbereich des Hydrolysats, zwischen den Testsubstanzen Lysin und Asparaginsäure, zwei zusätzliche Flecken in schwacher Konzentration auf.

Im mittleren Teil fehlte ein Fleck, wahrscheinlich Tyrosin, das bei der sauren Hydrolyse zerstört wurde.

Bei der zweidimensionalen Chromatographie mit den Systemen Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) in der ersten Richtung und Phenol 80%ig in zweiter Richtung zeigten beide Chromatogramme Übereinstimmung, während bei Verwendung von Äthylmethylketon/Pyridin/Wasser (70:15:15) als zweites Laufmittel die in Abbildung 17 mit 5, 6, 11 und 13 bezeichneten Flecken nach der Hydrolyse verschwunden, dagegen die mit 14 und 15 bezeichneten Flecken zusätzlich aufgetreten waren.

Zweidimensionale wiederholte Chromatographie im Durchlaufverfahren vor und nach saurer Hydrolyse eines Frischpflanzenauszugs aus Lithospermum officinale

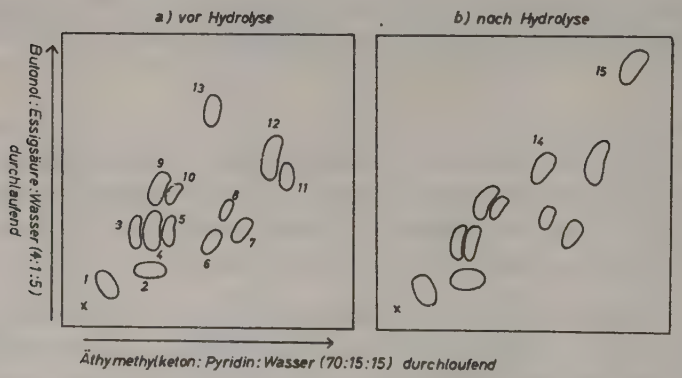


Abb. 17

Da die meisten bei Peptidhydrolysen neuauftretenden Aminosäuren lediglich die Mengen der bereits vorhandenen erhöhen, kann die Hydrolyse eines Gesamtextraktes bestenfalls orientierende Hinweise geben. Trotzdem darf auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse mit Peptiden gerechnet werden, wenngleich nur in geringen Konzentrationen. Zur näheren Untersuchung einzelner in Abbildung 17 beschriebener Aminosäuren des nicht hydrolysierten Ausgangsgemisches reicherten wir die mit 1, 2, 12 und 13 bezeichneten ninhydrinpositiven Flecken, die sich auch eindimensional trennen ließen, durch wiederholte präparative Papierchromatographie mit dem System Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) an. In Anlehnung an die Methode von CONSDEN, GORDON und MARTIN[159] hydrolysierten wir die aus Streifenchromatogrammen eluierten Zonen mit Salzsäure.

Die papierchromatographische Prüfung zeigte, daß der in Abbildung 17 mit 1 bezeichnete Fleck in 6 ninhydrinpositive Komponenten aufspaltete, die allerdings nur bei Chromatographie in hohen Konzentrationen sichtbar waren. Anhand von Testsubstanzen und differenzierenden Anfärbemethoden konnten wir ein- und zweidimensional die Aminosäuren Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin, Alanin und Valin identifizieren.

Die übrigen, in gleicher Weise papierchromatographisch untersuchten Flecken verhielten sich auch nach der Hydrolyse einheitlich. Zur Festlegung der N-endständigen Aminosäure von Fleck 1 führten wir ebenfalls nach CONSDEN, GORDON und MARTIN eine Desaminierung dieses Stoffes durch. Hierbei werden Peptide unter der Einwirkung nitroser Gase an der endständigen NH_2-Gruppe desaminiert und in die analogen Hydroxyderivate übergeführt. Nach saurer Hydrolyse werden die desaminierten Peptidreste als Hydroxysäuren abgespalten und treten bei der folgenden papierchromatographischen Untersuchung nicht mehr in Erscheinung.

---

159) R.J.CONSDEN, A.H.GORDON u. A.J.P.MARTIN, Biochem.J. 41, 590 (1947)

Die Abwesenheit von Arginin in unserem desaminierten Hydrolysat deutete auf ein basisches Peptid mit A r g i n i n als N-endständiger Aminosäure hin. Da für unsere Untersuchungen nur eine begrenzte Menge Frischdroge zur Verfügung stand, mußten wir auf eingehendere Untersuchungen, wie die Bestimmung der Aminosäuresequenz und des Carboxylendes verzichten.

Vermutlich handelt es sich bei dem genannten Peptid, das in sehr geringer Menge vorliegt, um eine der beiden im quantitativen Aminosäurechromatogramm (vgl. Abbildung 16) auftretenden Stoffe x_1 oder x_2, die in der Basenfraktion erschienen waren.

Die nähere Identifizierung dieses Stoffes wird nach Beschaffung weiteren Drogenmaterials vorgenommen.

J. Pharmakologische Untersuchung von Extrakten aus Lithospermum officinale L. und aus Lycopusarten

In ausführlichen Versuchen konnte KEMPER[160] am Meerschweinchen nachweisen, daß thyreotropes Hormon, das bei 37° mit einer Lösung von Trockenblattextrakten aus Lithospermum officinale inkubiert wurde, nach intraperitonealer Injektion seine Wirksamkeit ganz oder teilweise verloren hatte. Die Schilddrüse, die gewichtsmäßig und histologisch mit der von Kontrolltieren verglichen wurde, zeigte keine pathologischen Veränderungen. Zu analogen Ergebnissen kam KEMPER, als er weiblichen infantilen Ratten in gleicher Weise Trockenblattextrakte und gonadotrope Hormone verschiedener Herkunft subkutan verabreichte. Gonadotrope Wirkstoffe aus dem Hypophysenvorderlappen, aus dem Serum trächtiger Stuten sowie aus der Placenta wurden deutlich abgeschwächt, nicht aber adrenocorticotropes und somatotropes Hormon. Diese in vitro erhaltenen Ergebnisse konnten auch in vivo bestätigt werden, wenn die Hormonabschwächung im Tier selbst vollzogen wurde.

Alle beschriebenen pharmakologischen Versuche wurden in Ermangelung genauer Kenntnisse der Inhaltsstoffe und des wirksamen Prinzips mit Gesamtextrakten ausgeführt.

---

160) F.KEMPER, Arzneimittel-Forsch. 9, 368, 411 (1959)

Die pharmakologische Prüfung einzelner Fraktionen aus Lithospermum officinale muß Gegenstand einer weiteren Arbeit sein. Im folgenden haben wir trotzdem mit einigen Testen begonnen, um für die späteren biologischen Prüfungen Hinweise zu erhalten.

Naheliegend war zunächst die Untersuchung der Aminosäure- und Peptidfraktion, da hier eine pharmakologische Wirksamkeit durchaus möglich ist. Als Maß für den antigonadotropen Effekt zogen wir die Abschwächung von Serumgonadotropin*) und für den antithyreotropen Effekt die Metamorphosehemmung an Kaulquappen heran.

Da KEMPER, LOESER und RICHTER[161] auch für Gesamtextrakte aus Lycopus virginicus eine antigonadotrope und antithyreotrope Aktivität feststellen konnten und andererseits durch die Untersuchungen von HÖRHAMMER, WAGNER und SCHILCHER[162] die wesentlichen Inhaltsstoffe von Lycopus europaeus bekannt waren, bezogen wir auch Lycopusarten in unsere Untersuchungen mit ein.

I. Antigonadotrope Wirksamkeit

Aus THYREOGUTT "Schwabe", einer Arzneispezialität, die Extrakte verschiedener Lycopusarten enthält (Fraktion T) und aus Lithospermum officinale (Fraktion L) stellten wir nach VIRTANEN[163] in beschriebener Weise salzfreie aminosäure- und peptidhaltige Extrakte her. Nach Inkubation mit Serumgonadotropin PMS (ANTERON "Schering") unter physiologischen Bedingungen bei 37° wurden die Extrakte 25 weiblichen infantilen Ratten injiziert. Nach Tötung der Tiere am sechsten Tage wurden Ovarien und Uteri gewogen und histologisch untersucht. Als Vergleich dienten unbehandelte sowie mit reinem Hormon behandelte Tiere. Das E r g e b n i s dieses in-vitro-Versuches war, wie in Tabelle 9 dargestellt, für beide Fraktionen, selbst bei Anwendung hoher Dosierungen, negativ. Die histologischen Befunde

161) F.KEMPER, A.LOESER u. A.RICHTER, Arzneimittel-Forsch. 11, 92 (1961)
162) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. H.SCHILCHER, Arzneimittel-Forsch. 12, 1 (1962)
163) A.I.VIRTANEN, Angew.Chem. 67, 381 (1955)
*) Für die Durchführung des antigonadotropen Tests danken wir Herrn Professor Dr. A. Loeser, Direktor des Pharmakologischen Instituts der Universität Münster.

der Versuchstiere glichen denen der mit reinen Hormonen behandelten. Geringe Gewichtsabweichungen von Uterus und Ovarium sind hierbei als unspezifisch anzusehen.

Tabelle 9

Prüfung von Fraktion T und Fraktion L auf antigonadotrope Wirksamkeit

Lfd.Nr. d.Versuchsgruppe	Behandlung	Mittel der Körpergewichte (g) 1.Tag	6.Tag	Mittelgewichte von Ovarium mg	Uterus mg	Histologische Befunde
1	Kontrollen phys.Kochsalzlsg.	48.0	64.0	15.6	25.3	normales Uterus-Schleimhautrelief;im Ovar keine Corpora lutea
2	10 IE PMS (Anteron)	48.6	66.0	57.0	64.2	"sezernierende" Uterusschleimhaut;viele Corpora lutea
3	10 IE PMS + 1 ml "Fraktion T"	48.8	61.4	35.4	74.8	histologische Befunde im wesentlichen wie in Gruppe 2
4	10 IE PMS + 1 ml "Fraktion L"	48.2	68.2	46.0	54.2	histologische Befunde im wesentlichen wie in Gruppe 2

II. Antithyreotrope Wirksamkeit

1. Beeinflussung der Metamorphose des Kaltblüters durch schilddrüsenwirksame Substanzen

Während die histologischen Veränderungen der Schilddrüse nach Verabreichung von thyreotropem Hormon, die sich durch Epithelwucherung, Verarmung an färbbarem Kolloid und Deformierung der Acini bemerkbar machen[164], oft schwer zu beurteilen sind, lassen sich am Kaltblüter (Kaulquappe oder

164) F.EICHHOLTZ, "Lehrbuch der Pharmakologie", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957, S. 69

Axolotl) Metamorphosestadien so sehr beeinflussen, daß deutlich erkennbare morphologische Veränderungen zu beobachten sind. Allerdings besitzt der Kaulquappentest eine geringere Spezifität und keine strenge Gültigkeit für die Wirksamkeit am Säugetier oder am Menschen.

Die Kriterien der Schilddrüsenwirkung an Kaulquappen[165] zeigen sich durch:

a) rapider Abbau des Schwanzes
b) beschleunigte Entwicklung der Hinterbeinknospen und Durchbruch der Hinterbeine
c) beschleunigte, aber mangelhafte Ausbildung und Differenzierung der Vorderbeine ("Extremitätenstummel")
d) typische Veränderungen der Kopfform
e) Verringerung des Körpergewichts.

Umgekehrt bewirken antithyreoidale Substanzen Metamorphosehemmung und gleichzeitige Wachstumssteigerung, d.h., Gewicht, Längen- und Breitenmaße der Tiere sind bei zurückbleibender Differenzierung vergrößert.

2. Versuchsmaterial, Methodik und Diskussion der Ergebnisse

Als Versuchstiere verwendeten wir die aus Laichballen von Rana temporaria (Grasfrosch) gezüchteten Kaulquappen. Aufzucht, Fütterung und Wasserwechsel erfolgte in Anlehnung an die Versuchsanordnungen von KEMPER[166] und LOESER, MIKULICZ und RITTER[167].

Nach BOMSKOV[168] sind pH, Temperatur und Gehalt des Wassers an Ca- und Fe-Ionen für einen störungsfreien Verlauf der Metamorphose von Wichtigkeit. Wir benutzten abgestandenes Teichwasser*), das nach eingehender Prüfung den Anforderungen genügte.

Als Prüfsubstanzen führten wir zu:

a) wässrige Totalextrakte aus Lithospermum officinale und

165) CH.BOMSKOV, "Methodik der Hormonforschung", Bd.I, Stuttgart 1937, S. 271
166) F.KEMPER, Arzneimittel-Forsch. 9, 368, 411 (1959)
167) A.LOESER, K.MIKULICZ u. K.RITTER, Acta endocrinol. 20,293 (1955)
168) CH.BOMSKOV, "Methodik der Hormonforschung",Bd.I,Stuttgart 1937, S. 264
*) Bezugsquelle: Botanischer Garten der Universität München

Lycopus virginicus, von der letztgenannten Droge auch Preßsaft

b) die Säuren- und Neutralstoffraktionen beider Drogen, erhalten durch Austauschchromatographie

c) die auf gleiche Weise erhaltenen Aminosäure- und Peptidfraktionen

d) eine Aminosäuremodellmischung, hergestellt nach den Ergebnissen der quantitativen Analyse von THYREOGUTT und einem alkoholischen Auszug aus verschiedenen Lycopusarten

e) Thyroxin (0.1 mg) bzw. Trijodthyronin (20 γ) als Vergleichssubstanzen.

Die Testsubstanzen wurden den Tieren täglich mit dem Wasser und dem Futter neu zugegeben.

Zur Beurteilung der Metamorphose von Versuchs- und Kontrolltieren registrierten wir täglich Rumpf- und Schwanzlänge der Larven, Durchbruch und Entwicklung von Vorder- und Hinterbeinen sowie die Ausbildung der fertigen Frösche. Daneben bestimmten wir anhand des "Kaulquappenwägeversuchs" nach ROMEIS[169] in gewissen Zeitabständen die Gewichtsveränderungen der Tiere. Die Metamorphosequoten der einzelnen Versuche sind in den Abbildungen 18, 22, 23 und 24 schematisch dargestellt.

169) B.ROMEIS, Endokrinologie 18, 10 (1937)

Hemmung der Metamorphose von Kaulquappen (Rana temporaria) unter dem Einfluß frisch bereiteter, täglich neu zugeführter Zubereitungen aus Lycopusarten (pro Versuch 20 Tiere /1 Teichwasser).

Versuch A: Versuchsdauer 34 Tage

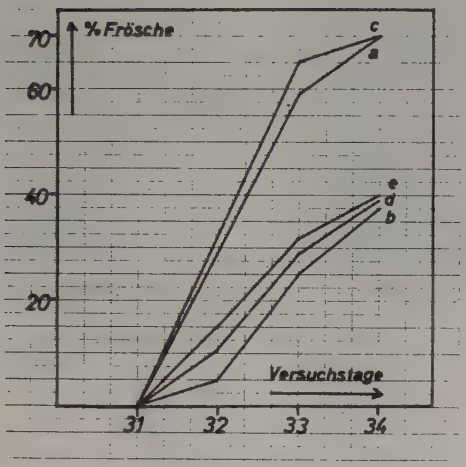


Abb. 18

a = Kontrollversuch

b = 3 ml Preßsaft aus Lycopus virginicus, entsprechend 5.2 g Droge

c = Neutralstoffe und Anionen aus 3 ml Preßsaft

d = Aminosäuren aus 3 ml Preßsaft

e = 4 ml Aminosäuremodellmischung analog THYREOGUTT, entsprechend 4 ml Handelspräparat

Wie in Abbildung 18 dargestellt, hatten 70% der Kontrolltiere (a) und der mit Neutralstoffen und Anionen behandelten Tiere (c) am 34. Tage die Metamorphose beendet, während die mit Totalextrakt (b), Aminosäurefraktion (d) und Aminosäuremodellmischung (e) versetzten Versuchsgruppen in der gleichen Zeit lediglich eine Metamorphosequote von 38 - 40% aufwiesen. Der verwendete Preßsaft aus Lycopus virginicus

und die daraus hergestellte Aminosäurefraktion sowie die Aminosäuremodellmischung waren somit eindeutig wirksam.

Bereits vor Ausbildung der fertigen Frösche waren im Verlauf der Metamorphose auch unterschiedliche Wachstumsraten zu verzeichnen. Beispielsweise zeigen Tabelle 10 und die photographischen Aufnahmen in den Abbildungen 20 a - e, daß mit der Metamorphosehemmung eine geringe Wachstumshemmung, insbesondere der hinteren Extremitäten einherging. In Abbildung 19 sind die Tiere bei Versuchsbeginn und in Abbildung 21 die mit Trijodthyronin behandelten, abnorm entwickelten Tiere am 20. Versuchstage, kurz vor dem Exitus einander gegenübergestellt.

T a b e l l e 10

Längenmaße der einzelnen Versuchsgruppen von Versuch A am 31. Versuchstage. (Gruppenbezeichnung wie in den Abbildungen 20 a - e)

Versuchsgruppe	mittlere Länge (mm)		Gesamtlänge
	Rumpf	Schwanz	
a	12	25	37
b	12.5	28	40.5
c	11.5	25.5	37
d	12.5	29	41.5
e	12	27	39

Photographische Aufnahme der Tiere von Versuch A vor Substanzzufuhr

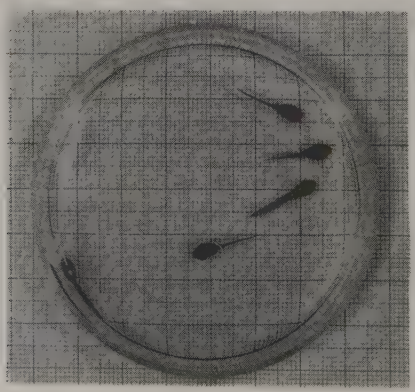


Abb. 19

Abbildungen 20 a - e

Photographische Aufnahmen der Gruppen a - e von Versuch A am 31. Versuchstage. (Die Bezeichnungen 1, 3, 5, 7 und 8 sind laufende Versuchsnummern, die durch die Angaben a - e hinfällig geworden sind).

Versuchsgruppe a

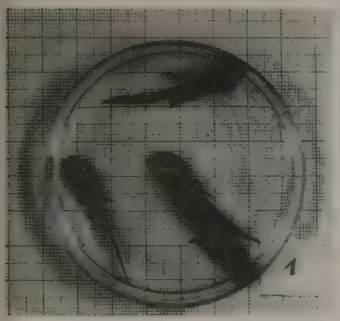


Abb. 20 a

Versuchsgruppe b

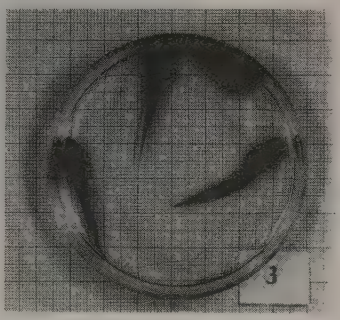


Abb. 20 b

Versuchsgruppe c

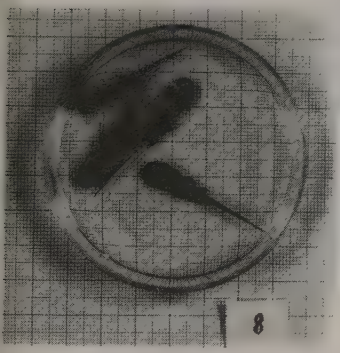


Abb. 20 c

Versuchsgruppe d

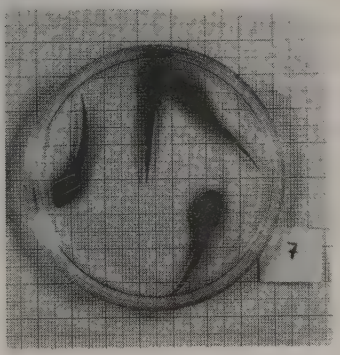


Abb. 20 d

Versuchsgruppe e

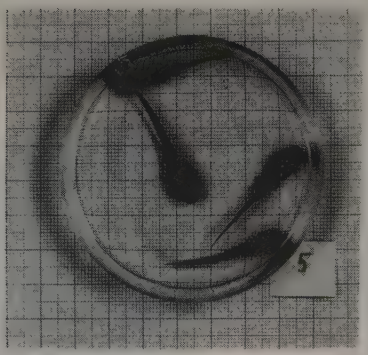


Abb. 20 e

Photographische Aufnahme der Versuchstiere A nach 20tägiger Behandlung mit 20 γ Trijodthyronin

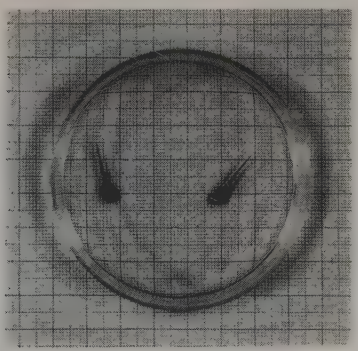


Abb. 21

Auch bei Gegenüberstellung der durchschnittlichen Körpergewichte zeigten sich bei den einzelnen Versuchsgruppen Unterschiede.

T a b e l l e 11

Gewichtszunahmen der Gruppen von Versuch A am 34. Versuchstage

Gruppe	Gewichtszunahme in %, bezogen auf das Ausgangsgewicht (=100%)
a	1212
b	1318
c	1097
d	1223
e	1135

Demgegenüber war (vgl. Abbildung 22) die metamorphosehemmende Eigenschaft analoger Prüfsubstanzen aus getrocknetem Drogengut von Lycopus virginicus (Versuch B) nur gering.

Es unterblieb zwar bei den mit Totalextrakt behandelten Tieren (b) die Metamorphose vollständig, doch trat sie auch nach Beendigung der Substanzzufuhr innerhalb einer 14tätigen Beobachtungszeit nicht ein, so daß eine andauernde Schädigung der Tiere durch irgendwelche, beim Lagern der Droge entstandenen Abbauprodukte angenommen werden darf. Die geringe Hemmwirkung der Aminosäurefraktion in Gruppe d ist, ihrem Verhältnis zum Gesamtextrakt nach zu schließen, nicht als beweisend anzusehen. Interessant erscheint uns die Tatsache, daß die Aminosäuremodellmischung in Gruppe e, diesmal in hoher Konzentration zugeführt, keine Hemmwirkung entfalten konnte. Wir hatten bereits früher darauf hingewiesen, daß für die Wirkung der Aminosäuren eine mittlere Dosierung erforderlich ist.

Versuch B: Versuchsdauer 26 Tage
Versuchsanordnung wie unter A (Abbildung 18)

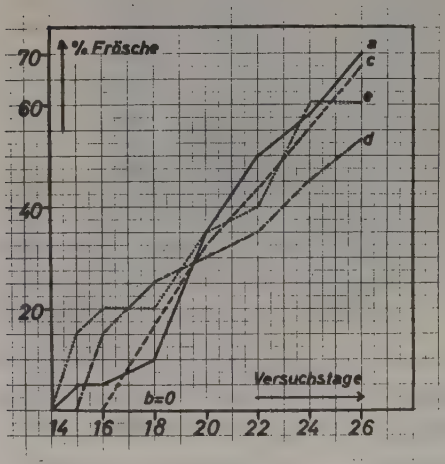


Abb. 22

a = Kontrollversuch
b = wässriger Extrakt aus 4 g Droge von Lycopus virginicus
c = Neutralstoffe und Anionen aus 4 g Droge
d = Aminosäuren aus 4 g Droge
e = 10 ml Aminosäuremodellmischung analog THYREOGUTT

Die Ergebnisse der Versuche C und D (siehe die Abbildungen 23 und 24), die mit wässrigen Extrakten aus Lithospermum officinale durchgeführt wurden, sind als negativ zu betrachten.

Selbst die Mengen an Gesamtextrakten, die mit Sicherheit wirksam sein müßten, wiesen praktisch gleiche Metamorphosequoten auf wie die Kontrollversuche. Der unregelmäßige Verlauf der Kurven in den Abbildungen 23 und 24 zeigt, daß verschiedentlich Spontanmetamorphosen eingetreten waren, die durch das Alter der Tiere oder durch Inaktivierung des wirksamen Prinzips bedingt sein mußten. Die Tiere, die zur Laichzeit Ende März aus Laichballen gezüchtet wurden, waren bei Versuchsbeginn bereits 3 bis

4 Monate alt. Als Droge stand nur Material vorjähriger Ernte zur Verfügung. Nach den Angaben von KEMPER[170] soll das wirksame Prinzip nur begrenzt haltbar sein.

Versuch C mit Lithospermum officinale: Versuchsdauer 36 Tage, Versuchsanordnung wie unter A (Abbildung 18)

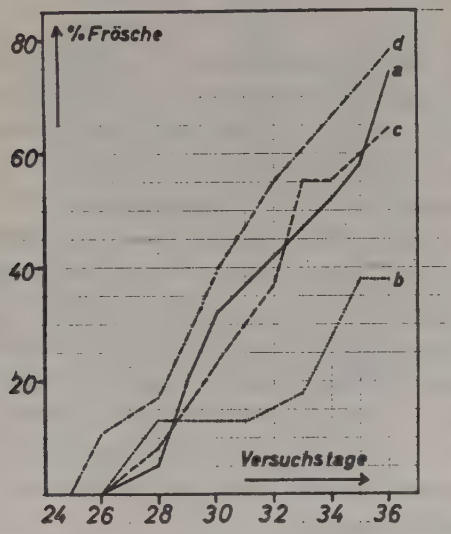


Abb. 23

a = Kontrollversuch

b = wässriger Extrakt aus 5 g Droge von Lithospermum officinale

c = Neutralstoffe und Anionen aus 5 g Droge

d = Aminosäurefraktion aus 5 g Droge

170) F.KEMPER, Arzneimittel-Forsch. 9, 368, 411 (1959)

Versuch D mit Lithospermum officinale: Versuchsdauer 28 Tage, Versuchsanordnung wie unter A (Abbildung 18)

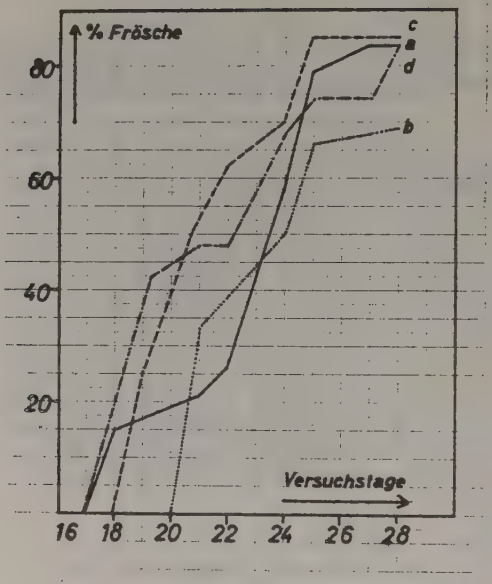


Abb. 24

a = Kontrollversuch

b = wässriger Extrakt aus 2 g Droge von Lithospermum officinale

c = Neutralstoffe und Anionen aus 2 g Droge

d = Aminosäurefraktion aus 2 g Droge

Diskussion der Metamorphoseversuche

Der positive Verlauf von Versuch A darf als Hinweis für eine eventuelle Wirksamkeit von Aminosäuren und niedermolekularen Peptiden in Lycopus virginicus aufgefaßt werden. Ähnliche Beobachtungen konnten wir bei Lithospermum officinale nicht feststellen. Entweder waren die Fraktionen unwirksam oder die Tiere besaßen infolge ihres Alters eine geringere Empfindlichkeit.

Als Schlußfolgerung ergibt sich hieraus für weitere pharmakologische Prüfungen von Drogen mit antithyreotroper Aktivität, daß als Untersuchungsmaterial unbedingt Frischdroge oder stabilisiertes Drogengut bzw. Trockenextrakte verwendet werden muß und daß die Fraktionierung mit Austauscherharzen durch indifferentere Methoden (z.B. Adsorptionschromatographie an Zellulose oder Kieselgel) ersetzt werden sollte. Da zur Prüfung der Fraktionen sehr große Substanzmengen benötigt werden und die dauernde Extraktbereitung viel Zeit erfordert, erhebt sich die Frage, ob die geringe Spezifität des Kaulquappenmetamorphosetests diesen Aufwand lohnt. Eine biologische Prüfung am Warmblüter scheint erfolgversprechender zu sein. Diesbezügliche Versuche mit Lithospermum officinale und Lycopusarten sind bereits im Gange.

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

A. Pflanzenmaterial

Lithospermum officinale L. wurde zur beginnenden Fruchtreife, Ende Juni bis Anfang Juli, auf einem etwa 2 km langen Wiesenstreifen entlang der Isar bei München-Freimann, nördlich der Brücke nach Unterföhring, gesammelt.

Zur Untersuchung gelangte die im Schatten rasch getrocknete, vom Hauptsproß befreite Herbadroge sowie die abgesiebten Teilfrüchte. Zur Prüfung auf Peptide verwendeten wir frisch gesammeltes Material.

B. Bereitung der Auszüge

Zur Vorprüfung auf einzelne Stoffklassen extrahierten wir die Droge nach den Vorschlägen von BRIEGER[171] und PAECH[172] stufenweise mit Petroläther, Äther, Chloroform, Methanol, 70%igem Äthanol und Wasser. Zunächst wurde das getrocknete Drogengut im Multimix bzw. die Teilfrüchte in der Drogenmühle zerkleinert. Anschließend extrahierten wir im Soxhlet mit den genannten Lösungsmitteln bis zur Farblosigkeit des Eluats. Das Einengen der Auszüge erfolgte im Vakuum. Die letzten Reste an Lösungsmittel entfernten wir durch Einblasen von Stickstoff. Für die Isolierungsarbeiten wurde das Lösungsmittelschema wie folgt abgewandelt:

Zur Phosphatidanreicherung Petroläther (Vorextraktion) und Chloroform/Methanol (3:1),
zur Gewinnung eines Gerbstoffgemisches und der unbekannten reduzierenden, inositähnlichen Substanz Petroläther und Chloroform (Vorextraktion) und Methanol.

Zur Isolierung von freiem Scyllit und einer Aminosäurefraktion gingen wir von wässrigen Extrakten aus, die durch zweistündige Kaltmazeration auf der Schüttelmaschine bereitet und durch Abpressen bzw. Zentrifugieren im Multipress geklärt wurden.

---

171) R.BRIEGER in G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. I, Wien 1931, S. 581
172) K.PAECH in PAECH-TRACEY, "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd. I, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956, S.17

Die Untersuchung der Peptidfraktion führten wir in gleicher Weise mit Frischdroge durch.
Mengenangaben sowie Ausbeuten finden sich bei den einzelnen Isolierungsgängen aufgeführt.

Untersuchung der Fettsäurefraktion

I. Isolierung

1. Hydrolyse

28.65 g Rohextrakt, den wir durch Petrolätherextraktion von 350 g gemahlenen Früchten erhalten hatten, verseiften wir eine Stunde auf dem Dampfbad mit 150 ml 15%iger Kalilauge in 90%igem Methanol. Als Oxydationsschutz setzten wir 1.5 g Ascorbinsäure hinzu. Nach dem Abkühlen verdünnten wir das Hydrolysat mit der doppelten Menge Wasser und schüttelten den unverseifbaren Anteil (11.4 mg = 0.04%) dreimal mit je 400 ml Petroläther aus. Die Petrolätherausschüttelung wuschen wir dreimal mit je 100 ml Wasser bis zur annähernd neutralen Reaktion der wässrigen Phase aus.

Die vereinigten wässrig-methanolischen Auszüge säuerten wir mit verdünnter Salzsäure auf ca. pH = 2 an und schüttelten die freigesetzten Fettsäuren dreimal mit 400 ml peroxidfreiem Äther aus. Die ätherische Lösung wurde mit Wasser säurefrei gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Sodann entfernten wir die Hauptmenge des Lösungsmittels bei niedriger Temperatur. Das letzte Drittel wurde durch Einblasen von Stickstoff abgedampft.
Die Ausbeute an Gesamtfettsäuren betrug 20.7 g.

2. Abtrennung der gesättigten Fettsäuren

Aus einer Lösung von 20 g der Gesamtfettsäuren in 100 ml Azeton schied sich innerhalb von 2 Stunden in der Kühltruhe bei -20 bis -30° ein weißer flockiger Niederschlag ab, der sich innerhalb weniger Minuten verflüssigte. Die Abtrennung vom Filtrat gelang durch rasches Abzentrifugieren in vorgekühlten Gläsern.

Nachwaschen mit Azeton und somit quantitative Abtrennungen waren aus dem genannten Grunde nicht möglich. Bei erneutem Abkühlen des Filtrats trat wiederum Niederschlagsbildung auf. Die Fraktionierung wurde in gleicher Weise vorgenommen. Diesen Arbeitsgang wiederholten wir unter jeweiligem Einengen der Lösung insgesamt fünfmal. Wir erhielten 25 ml einer konzentrierten Lösung, die annähernd frei von gesättigten Fettsäuren war.

Die einzelnen Fällungen untersuchten wir papierchromatographisch auf ihre Zusammensetzung. Die gesättigten Fettsäuren charakterisierten wir zusätzlich nach mehrmaliger Umkristallisation aus Eisessig/Wasser durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt. Die bei der Umkristallisation anfallenden Mutterlaugen wurden verworfen.

3. Fraktionierung der ungesättigten Fettsäuren

In gleicher Weise wie unter 2. beschrieben, erhielten wir durch dreifaches Ausfrieren bei -70° mit einer Kältemischung aus Trockeneis und Isopropanol Niederschläge in Mengen von 2.8, 1.6 und 0.9 g.

Sämtliche Arbeiten nahmen wir bei -25° und in Zentrifugengläsern vor, die auf -70° vorgekühlt waren.

Wie papierchromatographische Untersuchungen zeigten, war nach der dritten Fällung keine Zunahme des ungesättigten Charakters im Filtrat mehr zu verzeichnen.
Das Filtrat des letzten Niederschlags enthielt 9.2 g hochungesättigte Fettsäuren.

4. Multiplikative Verteilungen

Zur Gewinnung reiner Tetraensäure nahmen wir eine Craig-Verteilung über 100 Stufen in einer geschlossenen, vollautomatischen Apparatur für bewegte Oberphasen nach F.A.v. METZSCH[173] (Hersteller: Firma Otto Kühn, Göttingen) vor. Die Kapazität für Ober- und Unterphase betrug je 50 ml. Für eine Verteilung über 100 Stufen benötigten wir 12 l Lösungsmittelgemisch. Ober- und Unterphase wurden durch

173) F.A.v.METZSCH, Chemie-Ing.-Techn. 25, 66 (1953)

einstündiges Schütteln gegeneinander abgesättigt. In der Apparatur erfolgte erneute Sättigung der beiden Phasen, indem wir nach Einfüllen der Unterphase vor Beginn der Verteilung 5 Oberphasen mit den Unterphasen schüttelten, damit unter den Versuchsbedingungen keine Volumenänderungen (Phasenverschiebungen) auftreten konnten. Aus diesem Grunde füllten wir auch die in Ober- und Unterphase gelöste Substanz erst in das dritte Element ein.
Bei 50 Schüttelungen pro Verteilungsschritt betrug die Wartezeit zwischen zwei Arbeitsgängen eine Minute.
Die Verteilungen nahmen wir zum Schutz gegen Luftoxydation unter CO_2-Atmosphäre vor. Nach Beendigung einer Verteilung faßten wir den Inhalt zweier Elemente in einem 250 ml-Stehkolben zusammen und engten die Lösungen im Vakuumtrockenschrank bei 35 - 40° ein. Eine wesentliche Verkürzung der Trocknungszeit erreichten wir durch Zugabe von festem Natriumhydroxid als Trockenmittel, wodurch die nur mäßig flüchtige Ameisensäure aus dem Verteilungsgemisch rasch absorbiert wurde.

Die Rückstände lösten wir in je 1 ml Chloroform p.a. Auf Grund der papierchromatographischen Untersuchung faßten wir die Rückstände in einzelne Fraktionen zusammen.
Mehrere, im Scheidetrichter über 10 bzw. 16 Stufen vorgenommene Verteilungen erfolgten in analoger Weise mit je 100 ml Ober- und Unterphase. In diesem Falle untersuchten wir zuhächst Ober- und Unterphase getrennt (spätere Bezeichnung: O_x und U_y) und faßten sie erst anschließend in Fraktionen zusammen.
Wir verwendeten folgende Lösungsmittelsysteme:

System A		System B	
Ameisensäure 85%ig	10.0 T (Vol)	Ameisensäure 85%ig	10.0 T (Vol)
Azeton	58.8 T	Methanol	57.0 T
Wasser	1.2 T	Wasser	3.0 T
Benzin (50-75°)	80.0 T	Benzin (50-75°)	80.0 T

Daten zu den einzelnen Verteilungen:

1. Craig-Verteilung:
   Ausgangssubstanz: 2.0 g hochungesättigte Fettsäuren (Filtrat der Tiefkühlkristallisation bei -70°), 100 Stufen mit Lösungsmittelsystem A;
   Zusammenfassung:
   1.Fraktion: Elemente 31-34 6.9 mg reine Tetraensäure
   2.Fraktion: Elemente 35-52 1.068 g Tetraensäure u.a.
   3.Fraktion: Elemente 53-84 übrige Fettsäuren

2. Craig-Verteilung:
   Ausgangssubstanz: 0.75 g hochungesättigte Fettsäuren (Fraktion 2 der 1.Craig-Verteilung), 10 Stufen (im Scheidetrichter) mit System A;
   Zusammenfassung:
   1.Fraktion: O_{10} und U_2 3 mg reine Tetraensäure
   2.Fraktion: O_3-O_9 und U_3-U_8 0.55 g Tetraensäure u.a.
   3.Fraktion: O_2 und U_9 übrige Fettsäuren

3. Craig-Verteilung:
   Ausgangssubstanz: 5.25 g hochungesättigte Fettsäuren (Filtrat der Tiefkühlkristallisation bei -70°), 16 Stufen (im Scheidetrichter) mit System B;
   Zusammenfassung:
   1.Fraktion: O_{13}-O_{14} und U_4-U_5 9.4 mg reine Tetraensäure
   2.Fraktion: O_5-O_{12} und U_6-U_{11} 3.72 g Tetraensäure u.a.
   3.Fraktion: O_3-O_4 und U_{12}-U_{13} übrige Fettsäuren

4. Craig-Verteilung:
   Ausgangssubstanz: 3.72 g hochungesättigte Fettsäuren (Fraktion 2 der 3. Craig-Verteilung), 16 Stufen (im Scheidetrichter) mit System B;
   Zusammenfassung:
   1.Fraktion O_{14}-O_{15} und U_3 8.5 mg reine Tetraensäure
   2.Fraktion: O_7-O_{13} und U_4-U_{10} 2.35 g Tetraensäure u.a.
   3.Fraktion: O_1-O_6 und U_{11}-U_{15} übrige Fettsäuren

5. Craig-Verteilung:
Ausgangssubstanz: 2.35 g hochungesättigte Fettsäuren (Fraktion 2 der 4.Craig-Verteilung), 16 Stufen (im Scheidetrichter) mit System B;
Zusammenfassung:

1.Fraktion:	O_{14}-O_{15} und U_4-U_5	8.0 mg reine Tetraensäure
2.Fraktion:	O_5-O_{13} und U_6-U_{12}	1.72 g Tetraensäure u.a.
3.Fraktion:	O_2-O_4 und U_{13}-U_{14}	übrige Fettsäuren

6. Craig-Verteilung:
Ausgangssubstanz: 1.72 g hochungesättigte Fettsäuren (Fraktion 2 der 5.Craig-Verteilung), 16 Stufen (im Scheidetrichter) mit System B;
Zusammenfassung:

1.Fraktion:	O_{14}-O_{15} und U_3	9.5 mg reine Tetraensäure
2.Fraktion:	O_6-O_{13} und U_4-U_{11}	1.11 g Tetraensäure u.a.
3.Fraktion:	O_1-O_5 und U_{12}-U_{14}	übrige Fettsäuren

5. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten für das von uns modifizierte Lösungsmittelsystem B erfolgte gravimetrisch nach HECKER[174]. Je 1 g Caprin- oder Laurinsäure lösten wir in je 10 ml Ober- und Unterphase, die zuvor durch einstündiges Schütteln gegeneinander abgesättigt wurden.

Die Einstellung des Lösungsmittelgleichgewichts erfolgte durch fünfzigmaliges Schütteln.

Von jeder Phase wurden 5 ml im Vakuumtrockenschrank bei 30 - 35°C über festem Natriumhydroxid getrocknet und anschliessend gewogen.
Der Verteilungskoeffizient ergibt sich als Quotient aus den Auswaagen von Ober- und Unterphase.
Das Verhältnis der Verteilungskoeffizienten von Laurin- und Caprinsäure, die ein "kritisches Paar" mit der C_{18}-Trien- und der C_{18}-Tetraensäure bilden, stellt den sog. "Trennfaktor" für die beiden von uns getrennten Polyene dar.

174) E.HECKER, Z.Naturforsch. 8b, 77 (1953)

Tabelle 12

Daten zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

	Gewicht(mg) Oberphase	Gewicht(mg) Unterphase	Verteilungskoeffizient VK	Trennfaktor $\frac{VK\ Laur.}{VK\ Capr.}$ β
Laurinsäure	294.5	187.6	1.57	2.01
Caprinsäure	216.0	276.0	0.78	

II. Identifizierung

1. Hydrierung

a) Platinoxidkatalysator

Die Herstellung des Katalysators erfolgte nach der in HOUBEN-WEYL angegebenen Vorschrift[175].

b) Hydrierung im Mikromaßstab

Zur Hydrierung gelangte das bei -70° erhaltene Tiefkühlkristallisat. 8.5 mg Fettsäuregemisch, gelöst in 5 ml Eisessig p.a., hydrierten wir unter Zusatz von 10 mg Platinoxid in einer geschlossenen Apparatur (Typ MHYD der Firma Erich Eydam, Kiel) ohne Wasserstoffnachspeisung bei normalem Druck und normaler Temperatur.

Die Vorhydrierung des Katalysators sowie die Fettsäurehydrierung nahmen ungefähr je 2 Stunden in Anspruch. Der Wasserstoffverbrauch betrug 0.62 ml.

c) Hydrierung im präparativen Maßstab

Hydriert wurden 0.56 g Polyensäure aus der 2. Fraktion der 6. Craig-Verteilung. Die Hydrierung erfolgte gemäß VOGEL[176] ebenfalls in einer geschlossenen Apparatur bei Atmosphärendruck und normaler Temperatur.
Die Vorhydrierung von 400 mg Katalysator, suspendiert in 15 ml Eisessig p.a., dauerte 3 Stunden bei einem

175) HOUBEN-WEYL, "Methoden der Organischen Chemie", Allgemeine Chemische Methoden, Bd.IV/2, Stuttgart 1955, S. 170
176) A.I.VOGEL, "Practical Organic Chemistry", Third Edit.London 1959, S. 471

Wasserstoffverbrauch von 130 ml. Anschließend fügten wir die in weiteren 30 ml Eisessig p.a. gelöste Fettsäure hinzu und hydrierten unter dauerndem Rühren mit einem Magnetrührer 6 Stunden bis zu einem konstanten Wasserstoffverbrauch von 140 ml.

d) Untersuchung des Hydrierungsproduktes

Nach beendeter Wasserstoffaufnahme filtrierten wir vom Platinoxidkatalysator ab, verdünnten die Lösung mit der dreifachen Menge Wasser und schüttelten die Fettsäure mit gleichen Teilen eines Gemisches aus Chloroform/Äther (3:5) zweimal aus. Die mit Natriumsulfat getrocknete Lösung verwendeten wir zur papierchromatographischen Untersuchung. Zur Prüfung auf Vollständigkeit der Hydrierung führten wir mit einer 100 γ Polyensäure entsprechenden Menge Hydrierungsprodukt eine Tüpfelreaktion auf Papier durch. Wie der negative Ausfall der Reaktion mit Osmiumtetroxid zeigte, war die Hydrierung quantitativ verlaufen. (Empfindlichkeitsgrenze ca. 1 γ).

Zur Gewinnung analysenreiner Fettsäure kristallisierten wir den Rückstand aus den abgedampfen Ausschüttelungen dreimal mit 80%igem Äthanol um.
Smp. = 69.5° (nach Thiele, unkorr.)
Ausbeute: 75% der Theorie

$C_{18}H_{36}O_2$ (284.49)	Gef. C%	75.83	H%	12.85
	Ber. C%	75.99	H%	12.76

Zur Durchführung des Mischschmelzpunktes mußte die Testfettsäure zuvor unter gleichen Bedingungen umkristallisiert werden.

2. Alkali-Isomerisierung

2 - 3 mg isolierte Fettsäure bzw. Fettsäuregemisch erhitzten wir mit 1 ml 23%iger Kalilauge in Äthylenglykol 8 Minuten auf dem Ölbad bei 180°. Vor und während der Isomerisierung, die in Spezialgläsern von 15 cm Durchmesser und 11 cm Länge mit seitlichem Ansatzrohr und einem aufgesetzten Glasrohr vorgenommen wurde, leiteten wir Stickstoff durch

das Reaktionsgemisch. Die Gläser hielten wir mittels Vibrator in dauernder schwacher Bewegung. Nach dem Abkühlen lösten wir das erstarrte Isomerisat in warmem Methanol p.a. und ergänzten mit dem gleichen Lösungsmittel auf 50 ml. Die Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums der isomerisierten Fettsäure erfolgte im Zeiss-Opton-Spektralphotometer M 4 Q im Bereich zwischen 220 - 400 mμ gegen eine Blindlösung, die durch Verdünnen einer in gleicher Weise behandelten Lauge auf 50 ml erhalten wurde. Wenn die Extinktionsmaxima den Wert 1.0 überschritten hatten oder das Isomerisat stark dunkel gefärbt war, verdünnten wir die Lösungen auf 100 ml.

Zur Erkennung von konjugierten Doppelbindungen vor der Isomerisierung nahmen wir in analoger Weise das UV-Spektrum einer alkalisch-methanolischen Fettsäurelösung gegen methanolische Lauge als Blindlösung auf.

3. Quantitative Bestimmung eines Gemisches aus ungesättigten Fettsäuren

a) Berechnungsweise

Die Berechnung der einzelnen Säuren erfolgte nach den von KAUFMANN[177] angegebenen Gleichungen:

$$\% \text{ Tetraensäure} = 0.165\ k'_{314}$$

$$\% \text{ Triensäure} = 0.110\ k'_{268} - 0.088\ K'_{314}$$

$$\% \text{ Diensäure} = 0.109\ k'_{236} - 0.057\ k'_{268} - 0.026\ k'_{314}$$

Darin bedeuten die k'-Werte die Quotienten aus den Extinktionen E bei den angegebenen Wellenlängen und der Konzentration c in g/100 ml bei einer Schichtdicke d von 1 cm:

$$k' = \frac{E}{c \times d}$$

b) Durchführung des Versuchs und Meßdaten

1.5 ml einer chloroformhaltigen Lösung, die 3.057 mg eines nach der DFG-Einheitsmethode C IV 6a und 6b (57) hydrolysierten Fettsäuregemisches enthielt, isomerisier-

177) H.P.KAUFMANN, "Analyse der Fette und Fettprodukte", I Allgemeiner Teil, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958, S. 762

ten wir mit 1.5 ml 23%iger Kalilauge in Äthylenglykol 15 Minuten bei 180°. Zur Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums verdünnten wir das Isomerisat mit Methanol p.a. auf 50 ml. Im übrigen wählten wir die unter 2. beschriebene Versuchsanordnung.

T a b e l l e 13

Experimentelle Daten zweier quantitativer Bestimmungen bei einer Konzentration von 0.003057 g/50 ml

Nr.	Säure	E_{314}	E_{268}	E_{236}	k'_{314}	k'_{268}	k'_{236}	% Gehalt
1	Tetraensäure	0.347	-	-	113.7	-	-	18.74
2	Tetraensäure	0.332	-	-	108.9	-	-	17.95
1	Triensäure	0.347	1.46	-	113.7	478.0	-	43.52
2	Triensäure	0.332	1.35	-	108.9	442.5	-	39.95
1	Diensäure	0.347	1.46	0.785	113.7	478.0	257.2	-
2	Diensäure	0.332	1.35	0.964	108.9	442.5	315.5	6.37

4. Ozonisierung und Ozonidspaltung

Durch eine Lösung von 19.3 mg Tetraensäure in 15 ml Chloroform p.a. leiteten wir in einer Gaswaschflasche bei 0° einen Sauerstoffstrom, der über einen fünfzelligen Siemens'schen Ozonisator mit ca. 5% Ozon angereichert war. Das verdunstende Chloroform ersetzten wir im Laufe des Prozesses mehrmals. Nach zweistündiger Ozoneinwirkung war die Reaktion, wie die anschließende papierchromatographische Prüfung zeigte, quantitativ verlaufen. Zur Spaltung des Ozonids dampften wir das Chloroform durch Einblasen von Stickstoff ab, nahmen den Rückstand in einem Gemisch aus 6 ml Eisessig p.a. und 4 ml Perhydrol p.a.[178] auf und hielten die Lösung 40 Stunden im Thermostaten bei 35°C unter gelegentlichem Umschütteln. Das im Überschuß vorhandene Perhydrol entfernten wir anschließend durch 5 Minuten langes

178) E.KLENK u. W.BONGARD, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 290, 181 (1952)

Kochen. Die Lösung engten wir im Vakuum bei 35° auf wenige Tropfen ein. (Um auch die flüchtige Propionsäure nachweisen zu können, ist Einengen bis zur Trockne zu vermeiden).

Den Rückstand nahmen wir in 2 ml Äthanol auf. 1 ml der essigsauren Lösung verwendeten wir zur papierchromatographischen Prüfung auf Dicarbonsäuren, den Rest, nach Alkalisieren mit Ammoniak, zur Prüfung auf Monocarbonsäuren.

D. Untersuchung der Phosphatidgemische

I. Phosphatidanreicherung

1. Aus Früchten

350 g gemahlene Früchte entfetteten wir mit Petroläther und extrahierten die Phosphatide im Soxhlet mit Chloroform/Methanol (3:1). Den im Vakuum auf 100 ml eingeengten Auszug versetzten wir mit 500 ml Azeton. Es fiel sofort ein graubrauner Niederschlag aus, den wir nach mehrstündigem Stehen im Kühlraum bei -20° abzentrifugierten und in 25 ml der genannten Mischung lösten. Nach dreimaliger Umfällung mit je 125 ml Azeton erhielten wir die Rohphosphatide mit einer Ausbeute von 6.3 g (Naßgewicht). Die weitere Fraktionierung erfolgte durch Lösen in 50 ml Chloroform und Fällen mit der zehnfachen Menge absolutem Äthanol in der Kälte, wobei die "Lecithinfraktion" in Lösung blieb, die "Kephalinfraktion" dagegen ausgeschieden wurde. Die Ausbeute betrug nach zweimaliger Umfällung 0.288 g.

2. Aus Ganzdroge

Aus 1270 g Droge erhielten wir in analoger Weise 16.6 g eines Niederschlags (Naßgewicht), der außer Phosphatiden insbesondere Sterine, Wachse, Alkohole und Kohlenwasserstoffe enthielt.

Zu ihrer Entfernung führten wir eine Azeton-Heißextraktion im Soxhlet in der Weise durch, daß wir durch den Kühler aus einem Thermostaten Wasser von 53 - 55°C, 1 - 3° unterhalb

des Siedepunktes von Azeton, leiteten und zur Kühlung einen zweiten Kühler auf dem Soxhlet anbrachten. Wir erhielten 2.37 g Rohphosphatidgemisch und nach Fraktionierung 0.72 g "Kephalinfraktion" (Trockengewichte).

II. Identifizierungsmaßnahmen

1. Alkalische Hydrolyse (Prüfung auf Fettsäuren)
   100 mg Phosphatidgemisch aus Früchten bzw. 154 mg aus Ganzdroge hydrolysierten wir in der bei der alkalischen Hydrolyse der Fettsäuren beschriebenen Weise mit 15 ml 15%iger methanolischer Kalilauge unter Zusatz von 40 mg Ascorbinsäure 90 Minuten auf dem Dampfbad. Wir erhielten aus Früchten 30.75 mg und aus Ganzdroge 7 mg Fettsäuregemisch.

2. Saure Hydrolyse[179)]
   Zur Prüfung auf Kohlenhydrate, Inosit und Aminosäuren lösten wir 48.6 mg Phosphatidgemisch aus Früchten bzw. 116 mg aus Ganzdroge in 0.5 bzw. 1.0 ml Chloroform und emulgierten die Lösung mit 2.5 bzw. 5.0 ml 6n-Salzsäure. Nach dem Abziehen des Chloroforms im Vakuum hydrolysierten wir die Gemische 6 Stunden auf dem Dampfbad am Rückfluß. Zur abgekühlten Hydrolysenlösung fügten wir gleiche Mengen Wasser hinzu und schüttelten die lipoidlöslichen Stoffe dreimal mit je 5 bzw. 10 ml Äther aus. Die ätherischen Lösungen wuschen wir zweimal mit je 2 bzw. 4 ml Wasser und engten die vereinigten wässrig-salzsauren Lösungen im Vakuum zur Trockne ein. Reste von Salzsäure trieben wir durch zweimaligen Zusatz von etwas Eisessig im Vakuum aus.

   Zur papierchromatographischen Prüfung auf Kohlenhydrate und Inosit entsalzten wir den wasserlöslichen Rückstand mit Amberlite IR-120 (H^+-Form) und Amberlite IRA-400 (OH^--Form).

3. Alkali-Isomerisierung
   15.375 mg Fettsäuregemisch aus Früchten isomerisierten wir in der bei den Fettsäuren beschriebenen Weise. Da das Iso-

179) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.HÖLZL, Biochem.Z. 332, 269 (1960)

merisat infolge Verunreinigung durch organische Substanzen stark braun gefärbt war, mußte zur Aufnahme des UV-Spektrums die Lösung auf 400 bzw. 500 ml verdünnt werden. Eine quantitative Auswertung war daher infolge der starken Verdünnung nicht möglich.

4. Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs nach Kjeldahl

Die Substanzproben mineralisierten wir mit 1 ml Selen-Schwefelsäuregemisch 6 - 8 Stunden in einer Mikro-Kjeldahl-Apparatur. Nach Zusatz von 10 ml 33%iger Natronlauge destillierten wir den entstandenen Ammoniak in eine aus 10 ml Wasser und 2 ml 0.1n-Borsäure bestehende Vorlage über. Die Titration erfolgte mit 0.01n-HCl unter Verwendung des Mischindikators Methylrot-Methylenblau.

T a b e l l e 14

Daten zur Stickstoffbestimmung

Substanz	Einwaage mg	Verbrauch 0.01n-HCl (ml)	% N
Phosphatide-Ganzdroge	80.48	3.4 - 0.16 (Leerwert ml)	0.56
Phosphatide-Früchte	8.31	0.75- 0.11 (Leerwert ml)	1.08
Phosphatide-Früchte	16.62	1.67- 0.11 (Leerwert ml)	1.31

5. Bestimmung des gesamten und des anorganischen Phosphors

Den anorganischen Phosphor aus den Phosphatidgemischen von Früchten und Ganzdroge bestimmten wir nach papierchromatographischer Trennung, den Gesamtphosphor, wegen des zu erwartenden geringen P-Gehaltes, direkt nach der folgenden Methode[180]:

Die gewogenen Chromatogrammflecken bzw. die Lösungen veraschten wir im Reagenzglas mit 0.4 ml 70%iger Perchlorsäure, die mit Ammoniummolybdat gesättigt war, 4 Stunden bei 180°.

180) F.A.LISSAU, Dissertation, München 1960

Nach Zugabe von 2 ml Wasser und 10 Minuten Erhitzen im kochenden Wasserbad ließen wir abkühlen und fügten 0.3 ml 2.5%ige Ammoniummolybdatlösung und 0.3 ml 10%ige Ascorbinsäurelösung hinzu. Sodann erwärmten wir 2 Stunden im Thermostaten bei 38°.
Die auftretende Blaufärbung wurde im Zeiss-Spektralphotometer M 4 Q bei 820 mμ gemessen.

Als Blindwert diente eine Lösung der Reagenzien, die unter gleichen Bedingungen behandelt wurde. Außerdem führten wir einen Vergleichswert mit einer bekannten P-Menge (2 γ) und einen Papierwert des betreffenden Chromatogramms durch.

Berechnung: $$\gamma P = \frac{E_{absolut} \times \gamma P \text{ des Vergleichswertes}}{E_{Vergleichswert}}$$

$$E_{absolut} = E_{gemessen} - E_{Papierwert}$$

Tabelle 15

Daten zu den Bestimmungen des anorganischen Phosphors

Nr.	Phosphatid	aufgetragen ml *)	mg Papier	E gem.	E absol.	γP	%P
1	Früchte	0.01	61.85	0.404	0.344	1.17	1.4
2	Früchte	0.05	77.05	1.87	1.80	6.11	1.47
3	Früchte	0.1	91.85	1.74x2	3.39	11.5	1.38
4	Früchte	0.25	130.15	0.735x12	8.69	29.5	1.43
5	Papierwert	-	87.57	0.085	0.085	-	-
6	Ganzdroge	0.01	22.86	0.165	0.15	0.509	0.253
7	Ganzdroge	0.05	52.75	0.94	0.90	3.05	0.325
8	Ganzdroge	0.1	54.84	1.88	1.83	6.2	0.309
9	Ganzdroge	0.2	85.70	1.32x3	3.89	13.2	0.328
10	Papierwert	-	58.36	0.05	0.05	-	-
11	2 γ P	-	-	0.59	0.59	-	-

Tabelle 16

Daten zu den Bestimmungen des Gesamtphosphors

Nr.	Phosphatid	Menge ml *)	E gem.	E absol.	γP	%P
1	Früchte	0.05	0.99 x 5	4.95	17.1	4.11
2	Früchte	0.025	0.497x 5	2.485	8.57	4.13
3	2 γ P	-	0.58	0.58	-	-
4	Ganzdroge	0.501	0.825x 2	1.65	5.405	0.527
5	Ganzdroge	1.0	0.79 x 4	3.16	10.035	0.515
6	2 γ P	-	0.6075	0.6075	-	-

*) Die aufgetragenen Mengen beziehen sich auf Lösungen von 83.1 mg/10 ml (Früchte) und 201.2 mg/10 ml (Ganzdroge).

Der organische Phosphor ergibt sich als Differenz von Gesamtphosphor und anorganischem Phosphor. Die im allgemeinen Teil angegebenen Werte stellen Durchschnittswerte dar.

E. Isolierung und Identifizierung von Scyllit

I. Isolierungen

1. Freies Scyllit aus Lithospermum officinale und aus Eicheln

750 g gepulverte Ganzdroge von Lithospermum officinale bzw. 1.75 kg gemahlene Eicheln mazerierten wir mit 9 l kaltem Wasser 10 Stunden unter dauerndem Rühren. Den abzentrifugierten und filtrierten Extrakt versetzten wir mit 150 ml gesättigter neutraler Bleiazetatlösung. Der entstandene, abfiltrierte Niederschlag wurde gründlich mit kaltem Wasser ausgewaschen. Das auf ca. 1 l eingeengte Filtrat versetzten wir mit 150 bzw. 85 ml basischer Bleiazetatlösung, wobei ein weiterer Niederschlag auftrat, und kochten das Gemisch 10 Minuten lang. Anschließend filtrierten wir den Niederschlag ab und wuschen ihn mit 1 l heißem Wasser aus. Das auf ca. 100 ml eingeengte Filtrat entsalzten wir mit Amberlite IR-120 (H^+-Form) und Amberlite IRA-400 (OH^--Form) und engten die Lösung im Vakuum zur Sirupdicke ein.

a) Scyllit aus Lithospermum officinale

Den Sirup brachten wir durch Zusatz von Alkohol und Wasser auf eine Alkoholkonzentration von 70%. Hierbei kristallisierte das Scyllit aus. Die Umkristallisation erfolgte aus konzentrierter wässriger Lösung.
Smp. = 348 - 350° unter Zersetzung (nach Thiele, unkorr.)
Ausbeute: 0.03%

$C_6H_{12}O_6$ (180.16)	Gef.	C%	40.06	H%	6.80
	Ber.	C%	40.00	H%	6.71

b) Scyllit aus Eicheln

In 70%iger alkoholischer Lösung trat erst nach Zusatz von 2% Äther Kristallisation auf. Da das Scyllit mit Quercit verunreinigt war, kristallisierten wir zunächst aus 70%igem Äthanol und erst anschließend aus Wasser um.
Smp. = 349 - 350° unter Zersetzung (nach Thiele, unkorr.)
Ausbeute: 0.02%

$C_6H_{12}O_6$ (180.16)	Gef.	C%	40.38	H%	6.78
	Ber.	C%	40.00	H%	6.71

2. Scyllitazetat aus Lithospermum officinale

a) Ausgangsmaterial

Aus 1250 g mit Chloroform vorgereinigter und mit Methanol extrahierter Droge erhielten wir einen Auszug, den wir im Vakuum auf 100 ml einengten. Durch Vorlage eines Überschusses an absolutem Äthanol und tropfenweiser Zugabe des Extraktes (Verhältnis Äthanol/Extrakt 3:1) erhielten wir einen hellbraunen, grobflockigen Niederschlag, den wir sofort im Vakuum trockneten. Zur Reinigung digerierten wir die Substanz mit Äthylazetat am Rückfluß. Die Ausbeute betrug 16.5 g.

b) Azetylierung

15 g Äthanolfällung azetylierten wir mit Essigsäureanhydrid und wasserfreiem Natriumazetat (Verhältnis 1:5:1) 30 Minuten auf dem Ölbad bei 130°. Die Azetylierungslösung gaben wir in ein Eis-Wassergemisch.

c) Reinigung des Rohazetats über einer Magnesiumtrisilikatsäule

Die methanolische Lösung des Rohazetats brachten wir auf eine Säule von Magnesiumtrisilikat "Woelm" und eluierten mit reinem Methanol. Wir fingen 8 Fraktionen zu je 25 ml auf. Die stark braun gefärbten Verunreinigungen blieben teilweise am oberen Ende der Säule zurück, der Rest erschien im Eluat der 1. Fraktion. Die Fraktionen 2 - 6 zeigten Kristallbildung. Die dreimalige Umkristallisation erfolgte aus reinem Methanol.

Smp. = 289° unter Zersetzung (nach Thiele, unkorr.)

Ausbeute: aus 15 g Substanz 0.19 g Reinazetat

$C_{18}H_{24}O_{12}$ (432.39) Gef. C% 49.39 H% 5.64

Ber. C% 50.00 H% 5.59

II. Identifizierung

1. Chemische Nachweise

a) Probe nach Scherer

Einige Milligramm Substanz erhitzten wir mit einem Tropfen konzentrierter Salpetersäure im Platintiegel vorsichtig auf der Flamme. Zum erkalteten Rückstand gaben wir einige Tropfen 25%igen Ammoniak und einen Tropfen 10%ige Calciumchloridlösung. Nach vorsichtigem Eindampfen zur Trockne trat eine rosarote Färbung auf.

b) Probe nach Fischer-Kürten

3 mg Substanz und Bariumperoxid (1 mg) verrieben wir mit einem Tropfen Wasser und ließen das Gemisch auf dem Luftbad trocknen. Nach dem Erkalten fügten wir gleiche Mengen Natriumperoxid und Wasser hinzu, homogenisierten das Gemisch und erhitzten es über der nicht leuchtenden Flamme. Zum abgekühlten Gemisch gaben wir vom Rand des Tiegels her einige Tropfen konzentrierte Schwefelsäure, wobei intensive Rotfärbung auftrat.

2. Azetylierung

Die Azetylierung erfolgte in der zuvor beschriebenen Weise. Eine Reinigung durch Säulenchromatographie war bei reinem Scyllit als Ausgangsmaterial nicht erforderlich.

Lithosp.offic.: Smp. = 292° unter Zersetzung (nach Thiele, unkorr.)

Ausbeute: 23.3% der Theorie

$C_{18}H_{24}O_{12}$ (432.39)

Gef. C% 49.31 H% 5.37

Ber. C% 50.00 H% 5.59

Eicheln: Smp. = 291° unter Zersetzung (nach Thiele, unkorr.)

Ausbeute: 19.2% der Theorie

Gef. C% 49.77 H% 5.42

Ber. C% 50.00 H% 5.59

3. Vergleichende Perjodsäuretitration

Zu einer Mischung von 1 ml 1n-H_2SO_4 und 5 ml einer f r i s c h bereiteten Kaliumperjodatlösung, die in 1 ml 4 mg KJO_4 enthielt, gaben wir 1 ml wässrige Cyclitlösung (m-Inosit bzw. Scyllit) mit einem genauen Gehalt von ca. 1 mg pro ml. Nach verschiedenen Oxydationszeiten bei bestimmter Temperatur fügten wir rasch 0.5 ml 1n-NaOH und 2.5 ml 20%ige Natriumazetatlösung hinzu und titrierten nach Zugabe eines Körnchens Kaliumjodid das ausgeschiedene Jod mit 0.01n-$Na_2S_2O_3$. Gegen Ende der Titration versetzten wir mit einem Tropfen Stärkelösung.

Aus der Differenz der in einem Blindvers.verbrauchten Menge 0.01 n-$Na_2S_2O_3$ und der im Hauptversuch ermittelten Thiosulfatmenge berechneten wir den Kaliumperjodatverbrauch des Cyclits.

T a b e l l e 17

Daten der Perjodsäuretitrationen von Scyllit (1-5) und m-Inosit (6-10) bei einer Konzentration von 4 mg Kaliumperjodat und 1.03 mg Substanz in 1 ml Lösung

Nr.	Temperatur in °C	Dauer in Minuten	Kaliumperjodatverbrauch in ml 0.01 n-$Na_2S_2O_3$	in Mol
1	22	17	0.84	0.73
2	22	30	1.11	0.95
3	22	50	2.19	1.93
4	22	80	3.06	2.67
5	36-37	120	6.92	6.10
6	22	17	1.64	1.43
7	22	30	2.24	1.92
8	22	50	2.79	2.48
9	22	80	4.36	3.82
10	36-37	120	6.86	6.00

F. Untersuchung von Aminosäure- und Peptidfraktionen

I. Isolierung

1. Extraktbereitung

10 g gepulverte, getrocknete Ganzdroge mazerierten wir unter ständigem Schütteln mit 200 ml kaltem Wasser. Den abzentrifugierten Drogenrückstand extrahierten wir in gleicher Weise mit 150 ml Wasser. Die filtrierten wässrigen Lösungen fraktionierten wir durch Ionenaustauschchromatographie und untersuchten die im Vakuum eingeengten Extrakte papierchromatographisch auf Aminosäuren.

Zur Herstellung einer Fraktion, die neben Aminosäuren auch niedermolekulare Peptide in nennenswerter Menge enthalten kann, gingen wir unter Einsatz von zerkleinerter Frischdroge in gleicher Weise vor.

2. Ionenaustauschchromatographie

a) Aktivierung des Austauschers

Den stark sauren Kationenaustauscher Amberlite IR-120 ließen wir eine Stunde in Wasser quellen und schlämmten feine Austauscherteilchen ab. Zur Aktivierung versetzten wir das Harz mit 1n-NaOH und schüttelten es 10 Minuten auf der Schüttelmaschine. Die überstehende Lauge dekantierten wir und wuschen den nun in der Na^+-Form vorliegenden Austauscher dreimal mit reichlich Wasser nach. In gleicher Weise behandelten wir anschließend den Austauscher mit 1n-HCl. Die Aktivierung mit Lauge und Säure führten wir ein zweites Mal durch und schlemmten den Austauscher anschließend in eine Säule. Nach Auswaschen mit Wasser bis zur eben neutralen Reaktion des Waschwassers war die Austauschersäule gebrauchsfertig.

b) Fraktionierung des Extraktes

Den auf die Säule aufgetragenen Extrakt wuschen wir mit Wasser frei von Anionen und Neutralstoffen. Sobald das Waschwasser farblos war, eluierten wir die Aminosäuren mit 1 l 1n-Ammoniak. Die Eluate fraktionierten wir in der Weise, daß wir bis zur beginnenden alkalischen Reaktion

des ausfließenden Eluats etwa 600 ml, dann 4 - 5 Fraktionen zu je 50 ml und abschließend nochmals etwa 500 ml auffingen.

Die Prüfung der Eluate auf Aminosäuren, durchgeführt als Tüpfelreaktionen auf Papier und anschließendes Besprühen mit Ninhydrinlösung zeigte nämlich, daß die Aminosäuren erst bei alkalischer Reaktion in konzentrierter Lösung ohne Fraktionierung in den Vorlagen erschienen. Die Regelung der Tropfgeschwindigkeit war für den Trenneffekt bedeutungslos. Die Fraktionen à 50 ml, die praktisch die Gesamtmenge der Aminosäuren enthielten, engten wir im Vakuum auf ca. 80 ml ein. Für die quantitative Aminosäurebestimmung verdünnten wir die Lösung auf genau 100 ml.

3. Präparative Papierchromatographie

Zur Untersuchung und Hydrolyse einzelner ninhydrinpositiver Chromatogrammflecken reicherten wir die betreffenden Stoffe in folgender Weise an:
Nach orientierenden Versuchen mit Laufmitteln von gutem Trenneffekt für die zu trennenden Stoffe fertigten wir Streifenchromatogramme von etwa 15 - 20 cm Breite an, schnitten aus den entwickelten Chromatogrammen von Rand und Mitte schmale Zonen aus, die nach Anfärbung mit Ninhydrinlösung zur Lokalisierung der entsprechenden Substanzen dienten. Die markierten Zonen eluierten wir durch zweistündiges Schütteln mit Wasser/n-Propanol (3:1). Die filtrierten Lösungen dampften wir bei niedriger Temperatur im Vakuum zur Trockne ein.

II. Identifizierung

1. Quantitative Aminosäurebestimmung

Die Bestimmung wurde mit 1.5 ml eines aus 10 g Droge erhaltenen und auf 100 ml verdünnten Extraktes in einer vollautomatischen Apparatur nach HANNIG[181] durchgeführt.

181) K.HANNIG, Clin.Chim.Acta 4, 51 (1959)

2. Saure Hydrolysen

a) Hydrolyse des Gesamtextraktes

Den nach Trocknen von 1 ml Extrakt im Vakuumexsikkator erhaltenen Rückstand hydrolysierten wir mit 1 ml 6n-HCl 24 Stunden am Rückfluß auf dem Dampfbad. Das Hydrolysat trockneten wir im Vakuum über Phosphorpentoxid und festem Natriumhydroxid und nahmen den Rückstand in einigen Tropfen Wasser auf.

b) Mikrohydrolyse der Eluate aus Papier

Die Rückstände der Papiereluate nahmen wir in 0.03 ml 6n-HCl auf und hydrolysierten die Lösung in zugeschmolzenen, dickwandigen Kapillaren von 1.5 mm innerem Durchmesser 24 Stunden bei 100°. Das Zuschmelzen der Kapillaren erfolgte bei angelegtem Vakuum an das offene Ende. Die Entfernung der Salzsäure nahmen wir in der unter a) beschriebenen Weise vor.

3. Desaminierung

Den trockenen Rückstand der eluierten Chromatogrammzone behandelten wir in einem geschlossenen Gefäß 15 Minuten bei Raumtemperatur mit nitrosen Gasen, die durch Einwirkung von konzentrierter Salzsäure auf festes Natriumnitrit erzeugt wurden. Anschließend nahmen wir die Substanz in 0.03 ml 6n-HCl auf und trockneten sie im Vakuum über festem Kaliumhydroxid. Zur Entfernung der letzten Reste nitroser Gase wiederholten wir das Lösen und Trocknen mehrmals.
Die Hydrolyse der desaminierten Substanz erfolgte mit 6n-HCl 24 Stunden bei 100° in einer zugeschmolzenen Kapillare.

G. Prüfung auf Saponine

Das durch Fällung mit absolutem Äthanol aus methanolischer Lösung erhaltene Substanzgemisch untersuchten wir auf folgende Weise:

1. Saure Hydrolyse

100 mg Substanz hydrolysierten wir 2 Stunden mit 10 ml 14%iger Salzsäure. Die mit der doppelten Menge Wasser verdünnte Lösung schüttelten wir dreimal mit gleichen Teilen Äther aus. Die ein-

geengten ätherischen Lösungen wurden ohne weitere Reinigung papierchromatographisch auf Sapogenine untersucht. Den wässrigen Teil des Hydrolysates reinigten wir über einer Magnesolsäule. Nach Neutralisation mit Silberoxid prüften wir die eingeengte Lösung auf den Zuckeranteil.

2. Alkalische Hydrolyse

100 mg Substanz hydrolysierten wir mit 1 ml 10%iger alkoholischer Kalilauge 3 Minuten am Rückfluß auf dem Dampfbad. Die abgekühlte Hydrolysenlösung schüttelten wir dreimal mit je 10 ml Äther aus, wuschen die Ätherlösung dreimal mit 10 ml Wasser und engten sie auf 1 ml ein. Das Konzentrat wurde in Azeton gelöst und mit Aktivkohle gereinigt.

3. Liebermann-Burchard-Reaktion

10 mg Substanz lösten wir in 3 ml Chloroform und versetzten mit 2 ml einer Mischung, die aus 1 ml Schwefelsäure (d= 1.86) und 20 ml Essigsäureanhydrid bestand. Bei positiver Reaktion trat eine Farbfolge von rot über violett nach grün auf.

4. Molisch-Reaktion

Einige Milligramm Substanz versetzten wir mit 1 - 2 ml verdünntem Äthanol und einigen Tropfen einer 20%igen Lösung von α-Naphthol. Die Mischung unterschichteten wir mit konzentrierter Schwefelsäure. An der Grenzfläche trat ein blauer bis violetter Ring auf.

5. Hämolyse-Test

100 mg Substanz lösten wir in 2 ml blutisotonischer Kochsalzlösung und fügten die gleiche Menge einer Blutkörperchenaufschwemmung hinzu. Selbst nach 24 Stunden war keine hämolytische Wirkung sichtbar.

6. Eisenchloridreaktion

Auf Zusatz von 10%iger Eisen-III-chloridlösung zur Substanzlösung trat eine schmutziggrüne Färbung auf.

7. Cholesterinfällung

Zu einer heißen wässrig-alkoholischen Substanzlösung gaben wir eine heiße äthanolische Cholesterinlösung. Selbst nach mehrstündigem Stehen war keine Fällung zu beobachten.

H. Untersuchung der Gerbstoffraktion

Mit der unter E II und G beschriebenen Substanz führten wir mehrere Reaktionen auf Gerbstoffe des Gallussäure- und des Catechintyps durch:

1. Fällung mit Gelatine-Lösung (auf sämtliche Gerbstoffe)

Zu 2 - 3 ml einer 0.5%igen Lösung gaben wir tropfenweise gleiche Mengen einer 0.5%igen Gelatinelösung. Da durch Säurezusatz die Empfindlichkeit der Probe erhöht wird, fügten wir wenig 0.1 n-HCl hinzu. Bei pH = 3 - 4 trat zunächst Trübung, dann eine Fällung auf.

2. Bromwasserprobe (auf Catechine)

5 ml einer 0.4%igen Lösung versetzten wir mit 2%igem Bromwasser. Nach kurzem Aufkochen und 5 Minuten Wartezeit bildete sich ein Niederschlag.

3. Bleiazetatfällung (auf Gallotannine und Catechine)

Bleiazetat fällt in neutraler Lösung sämtliche, in essigsäurer Lösung nur die Gallotanningerbstoffe.
Zu einer Probe von 5 ml 0.4%iger Substanzlösung gaben wir 5 ml 10%ige Bleiazetatlösung, zu einer zweiten Probe fügten wir vor dem Bleiazetatzusatz 10 ml 10%ige Essigsäure hinzu. In essigsaurer Lösung trat keine, in neutraler Lösung eine gelbbraune Fällung auf.

4. Cyanidreaktion (auf freie Gallussäure)

Einige Tropfen Substanzlösung versetzten wir mit einer 10%igen Kaliumcyanidlösung. Es trat keine Fällung auf.

5. Formaldehyd-Salzsäure-Probe (auf Gallotannine und Catechine)

Zu 10 ml 0.4%iger Substanzlösung fügten wir 1 ml konzentrierte Salzsäure und 2 ml Formalinlösung hinzu. Nach 30 Minuten Er-

hitzen auf freier Flamme trat ein Niederschlag auf, der von Catechinen herrührte. Zu 2 ml des Filtrates gaben wir 0.2 ml 1%ige Eisenalaunlösung und 1 g festes Natriumazetat. Es trat eine schwache, für Gallotannine charakteristische Grünfärbung auf.

6. Griessmayer-Reichel-Reaktion (auf freie Ellagsäure)

Zu 2 mg Substanz gaben wir 5 ml Azeton, einige Kristalle Natriumnitrit und einige Tropfen Eisessig. Nach einiger Zeit müßte eine rotviolette Färbung auftreten. Die Reaktion verlief negativ.

7. Reaktion auf gebundene Ellagsäure

Zu einer verdünnten Lösung gaben wir einige Kristalle Natriumnitrit und 3 Tropfen 0.1 n-HCl. Eine sofortige karmesinrote, allmählich indigoblau werdende Färbung, die charakteristisch wäre, trat nicht auf.

8. Salzsäure-Fichtenspan-Reaktion (auf Catechine)

Ein Fichtenholzspan wurde mit der Substanzlösung befeuchtet und nach dem Trocknen mit konzentrierter HCl betupft. Nach einiger Zeit färbte sich der Span rot.

I. Prüfung auf organische Pflanzensäuren

1. Bleiazetatfällungen

a) Fällung im schwach sauren Medium

Den durch Vorbehandlung mit Chloroform und durch Methanolextraktion aus 500 g Droge erhaltenen, im Vakuum auf 100 ml eingeengten Auszug versetzten wir nach dem Ansäuern mit Essigsäure auf pH = 5 tropfenweise mit etwa 150 ml 10%iger neutraler Bleiazetatlösung bis zur quantitativen Fällung (Niederschlag I.)Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig Bleiazetatlösung und dann mit Wasser gewaschen.

b) Fällung im neutralen Medium

Das im Überschuß Bleiionen enthaltende Filtrat ergab auf Zusatz von 10%igem Ammoniak bis zur neutralen Reaktion einen weiteren Niederschlag (Niederschlag II), den wir mit basischer Bleiazetatlösung und dann mit Wasser auswuschen.

c) Fällung im alkalischen Medium

Nach Alkalisieren mit 10%igem Ammoniak und Zusatz von basischer Bleiazetatlösung entstand wiederum eine Fällung (Niederschlag III), die wir in gleicher Weise behandelten.

2. Fraktionierung der Niederschläge auf Grund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit

Den zuvor erhaltenen Niederschlag I suspendierten wir in 200 ml 90%igem Alkohol und erhitzten ihn 15 Minuten am Rückfluß. Die Mazeration wiederholten wir zweimal und säuerten die vereinigten Lösungen mit Essigsäure schwach an. Aus der Lösung fällten wir die Bleiionen durch Einleiten von H_2S aus, vertrieben das überschüssige H_2S durch dreistündiges Durchperlenlassen von CO_2 und engten den Auszug im Vakuum auf 100 ml ein (Lösung Ia). Den zurückbleibenden Niederschlag der Alkoholmazeration digerierten wir dreimal mit je 100 ml 10%iger Essigsäure in der Wärme. Die Lösung befreiten wir von Bleiionen und H_2S in der eben beschriebenen Weise (Lösung Ib) und schüttelten sie zehnmal mit Äthylazetat aus.

J. Prüfung auf Carotinoide

Aus dem Petrolätherauszug der Ganzdroge fiel beim Abkühlen ein ziegelrot gefärbter Niederschlag aus, den wir durch Umfällen aus Petroläther/Methanol (7:3) reinigten. Versuche, diesen Stoff zu fraktionieren, erfolgten durch P o l y a m i d c h r o m a t o g r a p h i e . Perlonpulver ULTRAMID K 228 BM 2 (BASF, Ludwigshafen) erhitzten wir eine Stunde am Rückfluß mit Methanol. Das abfiltrierte Polyamidpulver schlämmten wir in eine Säule mit 5 cm lichter Weite und 50 cm Höhe und wuschen die Säule solange mit heißem Methanol nach, bis beim Verdunsten des abtropfenden Lösungsmittels kein Rückstand mehr auftrat. Die in Methanol gelöste Substanz trugen wir auf die Säule auf und eluierten mit reinem Methanol bei einer Tropfgeschwindigkeit von 30 Tropfen/Minute. Die drei verschieden gefärbten Zonen, deren Wanderung wir im UV-Licht beobachteten, fingen wir getrennt auf. Zur Elution der obersten Zone, die an der Säule stark festgehalten wurde, war ca. 1 l Methanol erforderlich.

K. Gemeinsame Untersuchungsmethoden

I. Schmelz- und Mischschmelzpunkte

Die Schmelz- und Mischschmelzpunkte führten wir, soweit nicht anders vermerkt, im Schmelzpunktsapparat nach THIELE in Temperaturbereichen unterhalb 200°C mit konzentrierter H_2SO_4, bei höheren Temperaturen mit festem Paraffin durch.

Nur einzelne orientierende Bestimmungen erfolgten im Mikroschmelzpunktsapparat nach KOFLER. Die Werte sind nicht korrigiert.

II. UV-absorptionsspektrophotometrische Untersuchungen

Die Aufnahme der UV-Spektren nahmen wir im Zeiss-Opton-Spektralphotometer M 4 Q, je nach den zu erwartenden Maxima, im Bereich zwischen 200 - 500 mμ vor. Die Konzentrationen wechselten zwischen 2 - 20 mg Substanz in 100 ml Methanol p.a.

III. Infrarotspektren

Die IR-Spektren von Cycliten und Cyclitazetaten wurden nach dem Trocknen der Substanzen bei 80° in der Vakuumtrockenpistole in Konzentrationen von ca. 1 mg/300 mg KBr als Preßlinge im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 aufgenommen. Das IR-Spektrum der Stearinsäure wurde nach dem Trocknen im Vakuum mit Phosphorpentoxid und Paraffinschnitzel als Kristallfilm gemessen.

IV. Mikroanalysen

Sämtliche Bestimmungen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, durchgeführt.

Zur Ermittlung der CH-Werte wurden bei 90°C im Hochvakuum getrocknete Substanzen, für Azetyl- und Methoxylgruppenbestimmungen ungetrocknetes Material verwendet.

L. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographischen Prüfungen auf Sterine mit den Laufmitteln Benzol p.a. und Chloroform p.a. und auf Phosphatide mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) erfolgten auf Spiegelglasplatten von 4 mm Dicke und 12 x 20 cm Größe. Diese wurden mit einer Aufschlämmung von 5 g Kieselgel G zur Dünnschichtchromatographie nach STAHL "Merck" in 10 ml Wasser mit Hilfe eines Metallstreichers in einer Schichtdicke von ca. 200 µ bestrichen. Nach 30 Minuten Trocknungszeit bei 105° waren die Platten gebrauchsfertig. In absolut dicht verschlossenen Einmachgläsern von 15 cm Durchmesser und 25 cm Höhe ließen wir das Laufmittel 15 cm (Sterine; Laufzeit: 90 Minuten) bzw. 17 - 18 cm (Phosphatide; Laufzeit 90 Minuten) wandern. Zur Dokumentation zeichneten wir die entwickelten und angefärbten Platten auf Transparentpapier durch.
Anfärbereagenzien für

1. Sterine
   Eine gesättigte Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform; die Platten wurden 10 Minuten auf 100° erhitzt.

2. Phosphatide
   a) 0.2 g Ninhydrin in 95 ml Butanol + 5 ml 2n-Essigsäure; nach 7 Minuten Erhitzen auf 110° traten purpur bis violett gefärbte Flecken auf.

   b) Modifiziertes Dragendorff-Reagens
   Lösung I: 850 ml Wismutsubnitrat + 40 ml Wasser + 10 ml Eisessig;
   Lösung II: 8 g Kaliumjodid + 10 ml Wasser.
   Vor Gebrauch wurden 5 ml Lösung I, 5 ml Lösung II, 20 ml Eisessig und 100 ml Wasser gemischt. Es traten rotbraune Flecken auf.

   c) Ammoniummolybdat-Perchlorsäure
   3 g Ammoniummolybdat wurden in 25 ml Wasser gelöst und mit 30 ml 1n-HCl und 15 ml Perchlorsäure 60%ig gemischt. Nach 20 Minuten Erhitzen auf 105° waren blau gefärbte Flecken sichtbar.

M. Papierchromatographie

I. Methodik

Wir chromatographierten entweder absteigend in großen Glaskammern (20x50x60 cm) oder aufsteigend in 2 aufeinandergesetzten plangeschliffenen Einmachgläsern (Durchmesser: 15 cm; Höhe: 25 cm) bzw. in geschliffenen Glasglocken (Durchmesser: 28 cm; Höhe: 45 cm). Bei Verwendung einphasiger Systeme sättigten wir die Gefäße zuvor mit dem Laufmittel, bei Zweiphasensystemen mit der Unterphase.

Als Papiersorte verwendeten wir im allgemeinen Chromatogrammpapier Nr. 2043 b Gl der Firma Schleicher u. Schüll, Dassel Krs. Einbeck.

Abweichend hiervon chromatographierten wir
Fettsäuren mit Papier Nr. 2043 b Gl von Schleicher u. Schüll, das mit einer 10%igen bzw. 20%igen Lösung von Paraffin in Benzin nach Art der aufsteigenden Chromatographie imprägniert war,

Phosphatide auf einem mit Formaldehyd imprägnierten Papier[182] (entweder Schleicher u. Schüll Nr. 2043 b Gl oder Ederol Nr.208 der Firma J.C. Binzer, Hatzfeld/Eder),

Dicarbonsäuren und Monocarbonsäuren auf Chromatogrammpapier Nr. 2043 b gewaschen von Schleicher u. Schüll. Soweit Fluoreszenzen im UV-Licht beschrieben sind, beziehen sich diese auf eine UV-Quarzlampe H.P.W. 125 mit maximaler Strahlung bei 366 mμ.

Die Laufhöhen bei eindimensionaler Chromatographie betrugen aufsteigend durchschnittlich 20 - 25 cm, zur quantitativen Phosphatidbestimmung ca. 30 cm und zur Aminosäurechromatographie mit 80%igem Phenol 36 - 40 cm.

Absteigend chromatographierten wir durchweg 50 - 55 cm.

Durchlaufchromatogramme fertigten wir zusätzlich bei der Prüfung auf Kohlenhydrate und Cyclite (24 - 30 Stunden), Mono- und Dicarbonsäuren (24 - 30 Stunden) und Aminosäuren (24, 36, 48 und 60 Stunden) an.

---

182) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

Ausschließlich aufsteigend chromatographierten wir Carotinoide, Fettsäuren, Phosphatide, Alkaloide und Cumarine.

Ausschließlich absteigend chromatographierten wir organische Pflanzensäuren, Aminosäuren, Gerbstoffe, Saponine und die Säuren des oxydativen Fettsäureozonidabbaues.

Zur Trennung der Aminosäuren wandten wir die wiederholte Chromatographie an: Die mit Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) über 60 Stunden erhaltenen Durchlaufchromatogramme entwickelten wir ein zweites Mal in gleicher Weise.

Hierbei wurden die Aminosäuren mit hohem R_f-Wert zwar ausgewaschen, die tiefsitzenden ließen sich jedoch scharf trennen. Im Laufe der Prüfungen auf Aminosäuren und Abbaudicarbonsäuren der Fettsäureozonolyse zeigte es sich, daß einige Substanzen dieser Stoffklassen nur durch Anwendung der zweidimensionalen Methode trennbar waren.

Dicarbonsäuren wurden in beiden Laufrichtungen absteigend über 36 cm bei einer Laufzeit von 10 - 12 Stunden chromatographiert.

Aminosäuren chromatographierten wir in beiden Laufrichtungen meist 36 oder 48 Stunden nach der wiederholten durchlaufenden Methode. Ausnahmsweise chromatographierten wir bei Verwendung von 80%igem Phenol als Laufmittelpaarling 36 Stunden aufsteigend über 36 cm.

II. Fließmittel und R_f-Werte

1. Carotinoide
   Benzol/Petroläther/Azeton (20:5:4) (4 Std.)
   Benzol/Petroläther/Azeton/Methanol (40:10:4:1) (4-5 Std.)

2. Cumarine
   Petroläther/Benzol/Methanol p.a. (100:5:5) (4 Std.)
   Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) (7-8 Std.)

3. Alkaloide
   Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) (7-8 Std.)
   Isopropanol/Ameisensäure/Wasser (2:5:5) (8-9 Std.)
   Toluol/Isobutanol (1:1)(6-7 Std.)

4. Saponine

Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:2) (20 Std.)

Essigsäure 2%ig und 15%ig (9-10 Std.)

5. Kohlenhydrate

Pyridin/Äthylazetat/Wasser (2:7:1) (9-10 Std.)

T a b e l l e 18

Substanz	R_f	Substanz	R_f
Lactose	0.12	Sorbose	0.34
Galactose	0.24	Arabinose	0.35
Glucose	0.29	Xylose	0.42
Mannose	0.33	Rhamnose	0.54

6. Cyclite

T a b e l l e 19

Cyclit	Isopropanol/Essigsäure/ Wasser (3:1:1) (12 Std.)	Pyridin/Äthylazetat/ Wasser (2:7:1)(10 Std.)	Azeton 95%ig
m-Inosit u.Scyllit	0.14 - 0.17	0.08 - 0.10	0.13-0.16

7. Fettsäuren

Imprägnierung: I mit 10%iger II mit 20%iger Paraffinlösung

Laufmittel: I Eisessig (20 Std.) II Essigsäure 90%ig (20 Std.)

T a b e l l e 20

Säure	R_f I	R_f II	Säure	R_f I	R_f II
Stearinsäure	0.67	0.28-0.32	Linolsäure	0.85	0.55-0.60
Palmitinsäure	0.77	0.39-0.42	Linolensäure	0.90	0.70-0.75
Ölsäure	0.77	0.39-0.42	C_{18}-Tetraensäure	0.94	0.79-0.81

8. Phosphatide

Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) auf Formaldehydpapier (10 Std.)

T a b e l l e 21

Phosphatid	R_f	Phosphatid	R_f
Phytoglycolipid	0.13 u.0.22	Lyso-Phosphatidyläthanolamin	0.67 - 0.69
Lyso-Monophosphoinositid	0.30 - 0.33	Phosphatidyläthanolamin	0.70 - 0.75
Monophosphoinositid	0.40 - 0.42	Phosphatidylcholin	0.70 - 0.75
Phosphatidylserin	0.50 - 0.52	-	- -

9. Monocarbonsäuren (C_2-C_3).

1n-NH_3 in 78%igem Äthanol (24 Std.)

R_f-Werte: Peressigsäure: 0.30; Essigsäure: 0.36; Propionsäure: 0.41;

10. Dicarbonsäuren (C_2-C_6).

a) Butanol/ Essigsäure/Wasser (5:1:10) (10 u. 20 Std.)

b) 1n-NH_3 in 78%igem Äthanol (10 Std.)

c) Äthanol/Äthylamin 16%ig (8:2) (10-12 Std.)

d) Äthanol 95%ig (Vol)/NH_3(200 g/l)/Wasser (8:1:1) (20 Std.)

T a b e l l e 22

Säure	R_f a	R_f b	R_f c	R_f d
Oxalsäure	-	-	0.33	-
Malonsäure	0.56	0.11	0.36	0.16
Bernsteinsäure	0.73	0.22	0.44	0.24
Glutarsäure	0.80	0.27	0.50	0.28
Adipinsäure	0.86	0.30	0.54	0.35
Azelainsäure	0.93	0.46	0.66	0.49

Zweidimensionale Chromatographie:

a) Äthanol 95%ig (Vol)/Ammoniak (200 g/l)/Wasser (8:1:1)
1. Richtung (20 Std.)
Butanol/Ameisensäure 85%ig/Wasser (10:2:5; Oberphase)
2. Richtung (24 Std.)

b) Äthanol/Äthylamin 16%ig (8:2) 1. Richtung (24 Std.)
n-Propanol/Eucalyptol/Ameisensäure 98%ig (5:5:2; wassergesättigt) 2. Richtung (24 Std.)

11. Aminosäuren

a) Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) (20 Std.)
b) Phenol 80%ig (36 Std.)

T a b e l l e 23

Aminosäure	R_f a	R_f b	Aminosäure	R_f a	R_f b
Lysin	0.05-0.08	0.46	Alanin	0.20-0.25	0.59
Arginin	0.07-0.10	0.54	Prolin	0.26-0.30	0.88
Histidin	0.06-0.10	0.66	Tyrosin	0.34-0.38	0.58
Glycin	0.13-0.16	0.40	Phenylalanin	0.55-0.58	0.84
Serin	0.12-0.15	0.31	Methionin	0.40-0.45	0.79
Threonin	0.16-0.22	0.49	Valin	0.40-0.45	0.79
Asparag.säure	0.11-0.13	0.13	Leucin	0.55-0.60	0.83 - 0.86
Glut.säure	0.16-0.21	0.29	Isoleucin	0.55-0.60	0.83 - 0.86

Zweidimensionale Chromatographie:

a) Phenol 80%ig 1. Richtung (36 Std.)
Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) 2. Richtung (48 Std.)

b) Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) 1. Richtung (48 Std.)
Äthylmethylketon/Pyridin/Wasser (70:15:15) 2.Richtung (36 Std.)

c) Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) 1. Richtung (48 Std.)
Pyridin/Isoamylalkohol/Wasser (7:6:6) 2. Richtung (36 Std.)

d) Äthylmethylketon/Pyridin/Wasser (70:15:15) 1.Richtung (36 Std.)
Pyridin/Isoamylalkohol/Wasser (7:6:6) 2. Richtung (36 Std.)

12. Organische Pflanzensäuren
    a) Essigsäure 15%ig (9-10 Std.)
    b) Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) (20 Std.)

Tabelle 24

Säure	R_f a	R_f b
Kaffeesäure	0.45	0.82
Chlorogensäure	0.71	0.66
Ellagsäure	-	0.19

III. Anfärbereagenzien

1. Cumarine
    a) 1%ige äthanolische Kalilauge.
    b) Diazotierte Sulfanilsäure: Die kühl aufbewahrten Reagenzien I (0.5 g Natriumnitrit + 250 ml Wasser) und II (0.8 g Natriumsulfanilat + 245 ml Wasser + 5 ml konzentrierte Salzsäure)wurden vor Gebrauch zu gleichen Teilen gemischt.

2. Alkaloide
    Modifiziertes Dragendorff-Reagens: Siehe Dünnschichtchromatographie.

3. Organische Pflanzensäuren
    a) 2%ige Eisen-III-chloridlösung: Meist graue bis graugrüne Färbungen.
    b) 25%iger Ammoniak: Die den Dämpfen ausgesetzten Chromatogramme zeigten im UV-Licht blaue bis grüne Fluoreszenzen.
    c) 1%ige äthanolische Kalilauge: Nach Besprühen wie unter b).

4. Kohlenhydrate und Cyclite
    a) Anilinphthalatlösung: Die mit einer Lösung von 0.93 g Anilin und 1.66 g o-Phthalsäure besprühten Chromatogramme wurden 10 Minuten bei 110° getrocknet: Charakteristische Fluoreszenzen im UV-Licht.

b) Ammoniakalische Silbernitratlösung: 5 Minuten nach Besprühen mit einer Lösung von 0.85 g Silbernitrat, 24 ml 25%igem Ammoniak, 76 ml Wasser und 4 g festem Natriumhydroxid entwickelten wir die Chromatogramme über strömendem Wasserdampf: Reduzierende Zucker ergaben bereits bei normaler Temperatur, Cyclite erst in der Hitze schwarzbraune Färbungen.

5. Fettsäuren

a) Ungesättigte Fettsäuren: Die Chromatogramme setzten wir 40 - 60 Minuten dem Dampf von Osmiumtetroxid aus: Braune bis schwarze Flecken.

b) Sämtliche Fettsäuren: Die zweimal mit Wasser gewaschenen Chromatogramme wurden 15 Minuten in einer 1%igen Kupferazetatlösung gebadet, dann 1 Stunde mit fließendem Wasser ausgewaschen und ca. 5 Minuten in eine 1%ige Kaliumferrocyanidlösung gegeben: Rotbraune Flecken.

6. Phosphatide

a) Ninhydrin: Die Chromatogramme besprühten wir mit einer 0.2%igen Lösung von Ninhydrin in 95 ml Butanol und 5 ml 2n-Essigsäure und trockneten sie 7 Minuten bei 110°: Prolin ergab einen gelben, die übrigen Aminosäuren meist stahlblau bis violett gefärbte Flecken.

b) Phosphormolybdänsäure: Wir badeten die Chromatogramme 5 Minuten in einer 1%igen Phosphormolybdänsäurelösung und wuschen 1 Stunde mit fließendem lau-warmem Wasser aus. Dann tauchten wir 1 Minute in eine 1%ige Lösung von Zinn-II-chlorid in 3n-HCl und wässerten die Chromatogramme kurze Zeit: Cholinphosphatide ergaben blaue bis blaugrüne Flecken.

c) Rhodamin-B-Lösung: Wir färbten die Chromatogramme mit einer 0.5%igen wässrigen Lösung von Rhodamin B an und wuschen 1 Stunde mit fließendem Wasser aus: Nach dem Trocknen ergaben sämtliche Phosphatide rote Flecken.

d) Nilblau: Wir entwickelten die Chromatogramme 10 Minuten in einer 0.1%igen wässrigen Lösung von Nilblau und wuschen mehrere Stunden mit warmem Wasser aus: Sämtliche Phosphatide färbten sich blau an.

e) Ammoniummolybdat-Perchlorsäure: Die mit einer Lösung von 5 ml 60%iger Perchlorsäure, 10 ml 1n-HCl, 25 ml 4%iger Ammoniummolybdatlösung und 60 ml Wasser kräftig besprühten Chromatogramme wurden genau 7 Minuten bei 85° getrocknet und nach Behandeln mit strömendem Wasserdampf wenige Sekunden in H_2S-Gas eingetaucht: Phosphorsäureester ergaben blaue, freie Phosphorsäure gelbe Flecken.

7. Aminosäuren

a) Ninhydrin: Siehe Phosphatide.

b) Folin-Reagens: 0.2 g β-Naphthochinon-4-sulfonsaures Natrium wurden in 100 ml einer 5%igen Natriumkarbonatlösung (Natriumkarbonat, wasserfrei) gelöst. Genau 10 - 15 Minuten nach der Reagensbereitung wurden die Chromatogramme besprüht: Kräftige, verschieden gefärbte Flecken ("Buntchromatographie").

c) Isatin: Die Chromatogramme zogen wir durch eine Lösung von 1 g Isatin und 1 ml Pyridin in 100 ml Isopropanol und trockneten sie 24 Stunden bei Zimmertemperatur an der Luft: Differenzierte Färbungen, besonders empfindlich auf Prolin (Blaufärbung).

8. Saponine

a) 2%ige Eisen-III-chloridlösung: Siehe organische Pflanzensäuren.

b) Antimontrichloridlösung: Siehe Dünnschichtchromatographie.

c) Blutlösung: Die Chromatogramme wurden mit einer Mischung von 20 ml defibriniertem Rinderblut und 80 ml physiologischer Kochsalzlösung besprüht: Nach kurzer Einwirkungszeit müßte ein hämolytischer Hof auftreten.

d) Perjodsäure-Kaliumpermanganat-Benzidin: Wir besprühten mit 1%iger wässriger Natriumperjodatlösung, ließen 3 - 4 Minuten an der Luft hängen und besprühten mit einer 1%igen, frisch bereiteten Kaliumpermanganatlösung. Nach 5 Minuten Trocknen an der Luft wuschen wir das überschüssige $KMnO_4$ aus und besprühten die getrockneten Chromatogramme mit einer Lösung, bestehend aus 1 g Benzidin, 8 g Trichloressig-

säure, 20 ml Eisessig und 12 ml Wasser, mit Äthanol auf 160 ml aufgefüllt: Sämtliche Zucker und Glykoside müßten blaue Flecken auf bräunlichem Hintergrund ergeben.

9. Aliphatische Monocarbonsäuren

a) Ninhydrin: Die in ammoniakalischen Laufmitteln entwickelten Chromatogramme wurden mit einer 0.2%igen Ninhydrinlösung in Äthanol unter Zusatz von 50 mg Ascorbinsäure besprüht.

b) Silbernitrat-Glucose-Reagens nach GORE: Die Chromatogramme besprühten wir mit 1%iger Glucoselösung und nach dem Trocknen mit einer Mischung aus gleichen Teilen 0.1 n-$AgNO_3$ und 1n-NH_3. Das Entwickeln bei 105° erfolgte solange, bis weiße Flecken auf hellbraunem Hintergrund auftraten.

10. Aliphatische Dicarbonsäuren

a) Bromphenolblau: Eine 0.04%ige Bromphenolblaulösung wurde mit 0.1n-NaOH auf die Mischfarbe violett eingestellt: Gelbe Flecken auf blaugrünem Grund.

b) Bromkresolgrün-Bleiazetat: Die Chromatogramme wurden mit einer 0.04%igen Bromkresolgrünlösung in 96%igem Äthanol, die mit 0.1 n-NaOH auf die Mischfarbe blau eingestellt war, besprüht: Gelbe Flecken auf blauem Grund.
Nach Besprühen mit 3%iger wässriger Bleiazetatlösung traten Dicarbonsäuren als blaugrüne Flecken auf blauem Grund hervor, während sämtliche übrigen Säuren verschwanden.

11. Unterscheidung von Kohlenhydraten und Cycliten

a) Anilinphthalatlösung: Siehe Kohlenhydrate und Cyclite. Zucker gaben im UV-Licht verschiedenfarbige Fluoreszenzen, Zuckeralkohole nicht.

b) m-Phenylendiamin: Nach Besprühen mit einer 0.2 molaren Lösung von m-Phenylendiamin in 76%igem Äthanol zeigten Zucker im UV-Licht meist orangegelbe Fluoreszenzen, Zuckeralkohole reagierten nicht.

N. Pharmakologische Untersuchungen

I. Antigonadotrope Wirksamkeit

1. Extraktbereitung

Die Prüfung von Lithospermum officinale auf antigonadotrope Wirksamkeit erfolgte mit einem aminosäurehaltigen Extrakt, der in bereits beschriebener Weise nach VIRTANEN aus 15 g getrocknetem Drogengut bereitet wurde (Fraktion L). 100 ml Extrakt entsprachen 15 g Droge. Zur Untersuchung von Lycopusarten verwendeten wir das Handelspräparat THYREOGUTT "Schwabe", das, wie frühere Untersuchungen gezeigt hatten, ebenfalls stark aminosäurehaltig ist (Fraktion T).

2. In-vitro-Versuche an der Ratte

Die biologische Prüfung, die am Pharmakologischen Institut der Universität Münster durchgeführt wurde, erfolgte an weiblichen, infantilen Ratten mit einem Gewicht von ca. 50 g.
Als Prüfsubstanzen wurden den einzelnen Versuchsgruppen zugeführt:

Versuchsgruppe 1: Physiologische Kochsalzlösung (Kontrolltiere)
Versuchsgruppe 2: 10 IE PMS (ANTERON "Schering")
Versuchsgruppe 3: 10 IE PMS + 1 ml Fraktion T
Versuchsgruppe 4: 10 IE PMS + 1 ml Fraktion L

Die zugeführten Substanzen wurden in 0.5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und nach zweistündiger Inkubation bei 37° den Tieren subcutan injiziert.
Nach 6 Tagen wurden die Tiere getötet. Die präparierten Ovarien und Uteri wurden durch Wägung und histologische Untersuchung mit den unbehandelten Kontrolltieren verglichen.

II. Antithyreotrope Wirksamkeit

1. Herkunft und Haltung der Tiere

Mitte bis Ende März 1960 sammelten wir Laichballen von Rana temporaria (Grasfrosch) in den Altwässern der Isar bei München-Grünwald. Die vorsichtig transportierten Laichballen

brachten wir in frisches Wasser. Bei einer Raumtemperatur von 25° schlüpften aus den in Scheiben geschnittenen Ballen die Larven innerhalb weniger Tage aus. Dagegen wurde die Entwicklung der Tiere bei einer konstanten Temperatur von ca. 10° über Wochen gehemmt, so daß auch für spätere Versuche Tiere im frühen Entwicklungsstadium zur Verfügung standen. Laichballen, die faulige Stellen zeigten, erkennbar an der Auflösung der Zellkerne und am Geruch, wurden verworfen. Das Wasser wurde täglich erneuert.

Nachdem die Embryonen die Eihüllen verlassen hatten und die äußeren Kiemen verschwunden waren, wurden je 30 Tiere eines Aquariums täglich mit einer Messerspitze feinzerriebenem VITAWIL-Fischfutter (Firma Wührmann, Bremen) ernährt.

Die Analyse des für Aufzucht und Versuch verwendeten Wassers, das aus dem Botanischen Garten der Universität München stammte, ergab einen pH-Wert von 7.65. Der durchschnittliche Ca-Gehalt entsprach 5.8 deutschen Härtegraden. Eisen-, Kalium- und Phosphationen waren nicht vorhanden.

Nahrungszufuhr und Wasserwechsel erfolgten täglich. Als Aquarien verwendeten wir täglich frisch gereinigte 5 l Einmachgläser, die mit Wasserpflanzen des natürlichen Standortes (verschiedenen Minzearten) versehen waren.

2. Versuchsanordnung

Für eine Versuchsreihe verwendeten wir pro Einzelversuch 20 Tiere, die gleiche Entwicklungsstadien aufwiesen und aus dem gleichen Laichballen stammten.

Als Prüfsubstanzen erhielten die Tiere:

a) Thyroxin bzw. Trijodthyronin als Vergleichssubstanzen

b) wässrige Totalextrakte aus getrockneter Droge von Lithospermum officinale und Lycopus virginicus, die durch zweistündiges Schütteln 10%iger Drogenauszüge und Filtration bereitet wurden

c) einen Frischpflanzenauszug aus Lycopus virginicus (Preßsaft)

d) nach VIRTANEN aus b) und c) bereitete aminosäurehaltige und aminosäurefreie Extrakte

e) eine Aminosäuremodellmischung, die der quantitativen Analyse eines wässrigen Auszugs von THYREOGUTT entsprach. (vgl. Tabelle 25).

T a b e l l e 25

Aminosäuren	µM/0.5 cm^3	mg/0.5 cm^3	mg/%
Asparaginsäure	0.369	0.0491	9.82
Glutaminsäure	0.090	0.0132	2.64
Alanin	0.214	0.0191	3.82
Threonin	0.036	0.0043	0.86
Tyrosin	0.125	0.0136	2.72
Glycin	0.032	0.0024	0.48
Serin	0.114	0.0120	2.40
Valin	0.108	0.0126	2.52
Isoleucin	0.043	0.0056	1.12
Leucin	0.064	0.0084	1.68
Lysin	0.029	0.0042	0.84

Die Lösungen brachten wir mit physiologischer Kochsalzlösung jeweils auf ein einheitliches Volumen von 10 ml. Die pro Versuchsgruppe verabreichten Mengen sind in den Abbildungen 18, 22, 23 und 24 des Allgemeinen Teils aufgeführt.

Nahrungszugabe, Zufuhr der Prüfsubstanzen, Wasserwechsel und Reinigung der Gefäße erfolgten täglich. Da die Metamorphose außerdem temperatur- und lichtabhängig ist, nahmen wir die Versuche bei 19 - 20° und bei diffusem Tageslicht vor.

3. Registrierung der Metamorphosestadien

a) Kaulquappenwägeversuch

In Anlehnung an die Methode von ROMEIS fingen wir die Tiere einer Versuchsgruppe, je 20 Larven, in einem Sieb ("1.Fangsieb") und brachten sie in ein zweites Sieb

("Sammelsieb"), das in eine 2 - 3 cm hoch mit Wasser gefüllte Glasschale eingehängt war. Das Sammelsieb ließen wir kurz abtropfen und gaben die Tiere in ein anderes Sieb ("2.Fangsieb"), das wir unter mehrmaligem Hin- und Herneigen auf weiches, saugfähiges Gewebe (Papiertaschentücher) andrückten. Ein sog. "Wägesieb", das mit mehreren Filtrierpapierblättchen unterlegt war, stand vortariert auf einer gedämpften Analysenwaage bereit. Nach Überführung der Larven in dieses Sieb und erneutem Abtrocknen lasen wir nach genau 30 Sekunden einen Bruttowert ab, aus dem wir nach Zurückbringen der Tiere in das Aquarium unter Berücksichtigung des Tarawertes von feuchtem Sieb und Filtrierpapier das Gesamtgewicht der Tiere bestimmten.

Um Epithelschädigungen der Tiere und somit Beeinflussungen der Metamorphose im weiteren Verlauf des Versuchs zu vermeiden, verwendeten wir mit Ausnahme des Wägesiebs ausschließlich Kunststoffsiebe von 8 cm Durchmesser und 5 cm Höhe. Da das Gewicht der Tiere bis kurz vor Beendigung der Metamorphose stetig ansteigt, kann der Wägeversuch bis zur Ausbildung der fertigen Frösche in jedem Entwicklungsstadium vorgenommen werden. Wir führten die Wägungen zu Beginn, in der Mitte und gegen Ende eines Versuches durch.

b) Bestimmung der Körpermaße

Die im Sieb gefangenen Tiere brachten wir in eine mit Wasser gefüllte Petrischale, die mit Millimeterpapier unterlegt war. Die Schwanzlängen, Rumpflängen und Rumpfbreiten einer gleich großen Zahl von Tieren mit extremen Körpermaßen steckten wir mit einem Zirkel ab und berechneten daraus die Durchschnittswerte.

c) Photographie der Tiere

Mehrere Tiere einer Versuchsreihe mit mittleren Körpermaßen brachten wir in eine Petrischale. Zur Betäubung der Larven diente Wasser mit einem Zusatz von einem Tropfen Chloroform. Nach dem Photographieren der Tiere auf AGEPE-Film (Belichtungszeit 0.1 Sekunden, Blende 11) gaben wir sie zunächst in reines Wasser, dann in das Aqua-

rium zurück.
Die so behandelten Kaulquappen zeigten im weiteren Verlauf des Versuches keine Beeinträchtigung ihrer Reaktionsfähigkeit.

d) Organdifferenzierungen im Verlaufe der Metamorphose
Mittels einer Lupe verfolgten wir täglich die fortschreitende Ausbildung der Organe. Bei den mit Extrakten behandelten Tieren war eine deutliche Hemmung der Organdifferenzierungen im Vergleich zu den unbehandelten oder den mit Schilddrüsenhormonen versetzten Tieren zu verzeichnen.

Die Metamorphosestadien treten in folgender Reihenfolge auf:

1. Entwicklung der Hinterbeinknospen
2. Wachstum der Hinterbeine
3. die Abgrenzung zwischen Kopf und Rumpf tritt zurück; die Tiere nehmen mehr "Tropfenform" an
4. Durchbruch und Entwicklung der Vorderbeine
5. Rapider Abbau des Schwanzes und Einsetzen der Lungenatmung, womit die Frösche fertig ausgebildet sind.

O. Herkunft authentischer Substanzen

1. Vergleichssubstanzen für Papierchromatographie, Bestimmung der Verteilungskoeffizienten und quantitative Bestimmungen

Ein aus Sojabohnen isoliertes Phytoglycolipid erhielten wir von Herrn Privatdozent Dr.H.Wagner, ein Gemisch aus Monophosphoinositid und Phosphatidylserin von Herrn Dr.J.Hölzl, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, zur Verfügung gestellt.

Von der Firma Fluka AG, Buchs SG, bezogen wir Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylcholin.

Folgende Substanzen stammen von der Firma Dr.Th.Schuchardt, München: Öl-, Linol- und Linolensäure, Caprin- und Laurinsäure, Propion-, Malon-, Bernstein-, Glutar-, Adipin- und

Azelainsäure sowie Glucosamin.

Die Firma C.Roth, Karlsruhe, lieferte uns: β-Sitosterin, Ellag-, Chlorogen- und Kaffeesäure.

Aminosäuren, Kohlenhydrate und die Reagenzien für die quantitative Bestimmung von Fettsäuren und Phosphatiden stammen aus dem Fabrikationsprogramm der Firma E.Merck AG, Darmstadt.

2. Prüfsubstanzen für die pharmakologischen Untersuchungen

Preßsaft aus Lycopus virginicus stellte uns die Firma Dr.Madaus u. Co., Köln a.Rh., zur Verfügung.

Es stammen von den Firmen
Dr. W.Schwabe, Karlsruhe: THYREOGUTT-Tropfen
Deutsche Hoffmann-La Roche AG, Grenzach a.Rh.: THYROXIN-Tabletten (1 mg)
Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt-Hoechst: Trijodthyronin (THYBON-Tabletten (20 γ)
Wührmann, Bremen: VITAWIL-Fischfutter.

L e b e n s l a u f

Am 31. Oktober 1932 wurde ich, Heinz Wolfgang K ö n i g , als Sohn des Stadtoberinspektors Max König und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Stein, in Säckingen a.Rh. geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Säckingen trat ich im Jahre 1943 an das dortige neusprachlich-naturwissenschaftliche Gymnasium über. Im März 1952 erhielt ich das Reifezeugnis.

Im April 1952 begann ich meine Berufsausbildung mit einer zweijährigen Tätigkeit als Apotheker-Praktikant in der Stadt-Apotheke Säckingen. Nach bestandener pharmazeutischer Vorprüfung im März 1954 arbeitete ich sieben Monate als vorgeprüfter Apothekenassistent.

Im Winter-Semester 1954 nahm ich an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i.Br. das Pharmaziestudium auf und legte im September 1957 die pharmazeutische Staatsprüfung ab.

Mein Kandidatenjahr leistete ich in der Stadt-Apotheke Säckingen ab. Nach Erhalt meiner Bestallung als Apotheker am 15. Oktober 1958 arbeitete ich dort bis einschließlich April 1959.

Im Mai 1959 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer die vorliegende Arbeit. Sie wurde im Februar 1962 abgeschlossen.